

**Vergleich der Glykoproteine peripherer
Blasen und des Urins von Patienten
mit akuter lymphatischer Leukämie
mit den Glykoproteinmustern permanenter
Zelllinien nach Affinitätsmarkierung
mit Concanavalin-A**

Vorgelegt

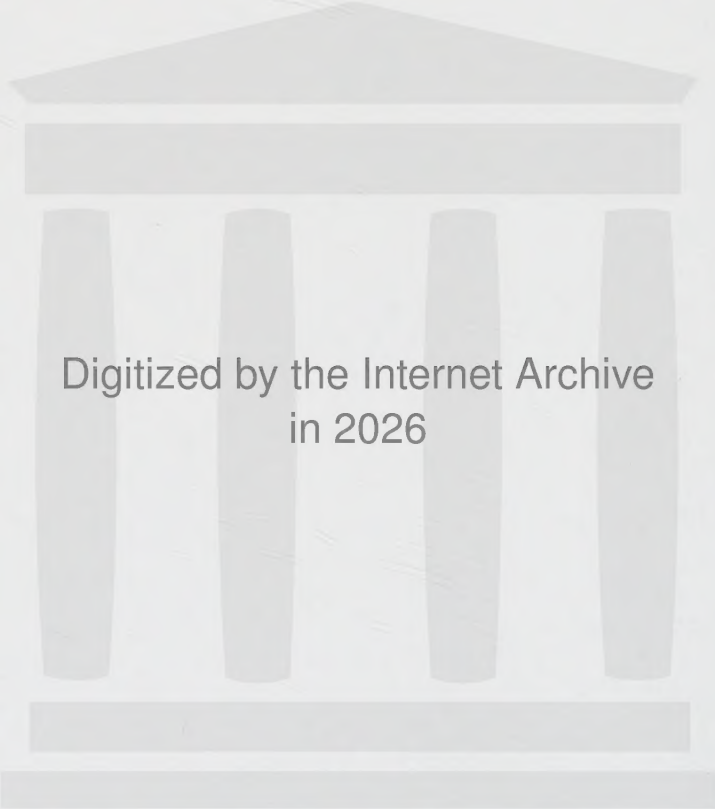
von

Jutta Baur

aus

Nürnberg





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546206_0042

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I der
Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof.Dr.W.Kersten

VERGLEICH DER GLYKOPROTEINE PERIPHERER BLASTEN UND DES
URINS VON PATIENTEN MIT AKUTER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE
MIT DEN GLYKOPROTEINMUSTERN PERMANENTER ZELLINIEN NACH
AFFINITÄTSMARKIERUNG MIT CONCAVALIN-A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Jutta Baur
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. A. Ogilvie
Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten
Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.1984

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

1.	Einleitung	1
1.1.	Heutiger Stand der Forschung und Therapie der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter	1
1.2.	Eigene Fragestellungen	2
2.	Theorie	5
2.1.	Änderungen des Zellglykoprotein- musters im Zusammenhang mit der malignen Entartung	5
2.2.	Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie	7
2.3.	Proteinauftrennung und Molekulargewichtsbestimmung mit der SDS-Gradientengel-Elektrophorese	14
2.4.	Struktur und Eigenschaften von Concanavalin-A	15
3.	Materialien und Methoden	17
3.1.	Materialien	17
3.2.	Methoden	21
3.2.1.	Ganzzellextrakte mit Natriumdodecylsulfat	21
3.2.2.	Ganzzellextrakte mit Triton X-100	21
3.2.3.	Aufarbeitung der Urinproben	22
3.2.4.	Jodierung von Concanavalin-A mit ^{125}J -Jodid	23
3.2.5.	SDS-Graddientengel-Elektrophorese	24

3.2.6.	"Affinitätsmarkierung" der Glykoproteine mit ^{125}J -Concanavalin-A	31
3.2.7.	Trocknen der Gele	31
3.2.8.	Autoradiographie	32
3.2.9.	Molekulargewichtsbestimmung der Glykoproteine	32
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Glykoproteinmuster nach "Affinitätsmarkierung" mit ^{125}J -Concanavalin-A	35
4.1.1.	Periphere Lymphozyten, durch PHA-Stimulierung gewonnene Lymphoblasten und Thymozyten	35
4.1.2.	Leukämische Zelllinien	39
4.1.2.1.	C-All-Linien	39
4.1.2.2.	T-ALL-Linien	43
4.1.2.3.	B-All-Linie	46
4.1.2.4.	Zusammenfassung	48
4.1.3.	Blasten aus dem Blut bzw. Knochenmark von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie	50
4.1.3.1.	C-All-Blasten	50
4.1.3.2.	T-ALL-Blasten	54
4.1.3.3.	Zusammenfassung	59
4.1.4.	Glykoproteinausscheidung im Urin unter zytostatischer Therapie	59
4.1.4.1.	Normalurin und Urinproben von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen als Kontrollproben	60
4.1.4.2.	Urinproben von Patienten mit C-All	62
4.2.	Empfindlichkeit der Methode	67

5.	Diskussion	69
5.1.	Glykoproteinmuster normaler lymphatischer Zellen, leukämischer Zelllinien und Blasten	69
5.2.	Glykoproteinausscheidung im Urin	74
6.	Zusammenfassung	77
	Literaturverzeichnis	78

Verzeichnis der Abkürzungen

ALL	akute lymphatische Leukämie
B-ALL	B-Zell-Typ der akuten lymphatischen Leukämie
C-ALL	"Common"-Typ der akuten lymphatischen Leukämie
C-ALL-A	"Common"-Typ-Antigen
CEA	carcinoembryonales Antigen
Con-A	Concanavalin-A
C3-R	Komplementrezeptor für C3
DATD	N, N'-Diallyltartardiamid
E-R	Schäfererythrozytenrezeptor
F _C -R	Rezeptor für das F _C -Fragment des Immunglobulins G
HLB-A	B-Zell-Alloantigen
HTLA	menschliches Thymuslymphozytenantigen
IgG	Immunglobulin G
Mol.-Gew.	Molekulargewicht
PAS-Reaktion	Perjodsäure - Schiff-Reaktion
PBS	Phosphate buffered saline
pCP	primär chronische Polyarthrit
PHA	Phytohämagglutinin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SmIg	Membranimmunglobuline
T-ALL	T-Zell-Typ der akuten lymphatischen Leukämie
TMED	N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin

1. Einleitung

1.1. Heutiger Stand der Forschung und Therapie der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphatische oder lymphoblastische Leukämie ist die wichtigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Als Ausgangspunkt der ALL werden allgemein unreife Vorstufen der Lymphozyten angesehen. Immunologische Untersuchungen ermöglichten eine Unterteilung der ALL in verschiedene Untergruppen und die Zuordnung zu den entsprechenden Vorläuferzellen der Lymphozytenentwicklung (THIEL et al., 1977). In der Klinik ist nur die Einteilung in C-ALL ("Common type" der akuten lymphatischen Leukämie), T-ALL (T-Zell-Typ der akuten lymphatischen Leukämie) und B-ALL (B-Zell-Typ der akuten lymphatischen Leukämie) üblich, wobei diese Gruppen z. T. noch weitere immunologische Untertypen umfassen. Inwieweit die Einordnung in eine bestimmte Untergruppe mit der Prognose der Erkrankung korreliert, ist noch umstritten. Etwa 80% der Fälle sind der C-ALL zuzuordnen, 15-20% der T-ALL und 2% der B-ALL (BROUET et al., 1974; BROWN et al., 1974; SEN und BORELLA, 1975; zitiert nach SCHNEIDER, 1981).

Die Therapie der ALL umfaßt verschiedene Phasen. In der Induktionsphase erfolgt eine Polychemotherapie, die die Hauptmasse der maligne entarteten Zellen beseitigen soll, und die sogenannte "Schädelprophylaxe", die gegen die Blasten im Zentralnervensystem gerichtet ist. Sie besteht aus der intralumbalen Gabe von Methotrexat und einer gleichzeitigen Bestrahlung des Schädels. Danach schließt sich eine zweijährige Re-

missionserhaltungstherapie mit verschiedenen Zytostatika an, während der noch eine Reinduktion erfolgt. Trotz der unbestreitbaren Erfolge dieser Behandlung - nach der West-Berliner Studie (RIEHM et al., 1977) trat bei 80% der Kinder mit einer initialen Leukozytenzahl von weniger als $25\,000/\text{mm}^3$ eine Dauerremission auf - dürfen die schwerwiegenden Nebenwirkungen der Therapie, unter der bis zu 5% der Kinder sterben, nicht übersehen werden. Auch das Ausmaß von Spätfolgen, wie genetische Schäden oder die Entwicklung von Zweittumoren, ist heute noch nicht abschätzbar.

Eine Fortführung der Untersuchungen an Leukämiezellen mit biochemischen Methoden könnte weitere Aufschlüsse über die Struktur der maligne entarteten Zellen bringen, die die Ergebnisse der immunologischen Forschung ergänzen. Damit entstehen vielleicht auch neue Ansatzpunkte für Diagnose und Therapie und so die Möglichkeit, durch ein gezielteres Angreifen an der entarteten Zelle die Behandlung wirkungsvoller und risikoärmer zu gestalten.

1.2. Eigene Fragestellungen

Wichtige Eigenschaften von Tumorzellen wie der Verlust der Wachstumskontrolle und die Metastasierungstendenz sind mit Änderungen im Glykoproteinemuster der Zellmembran verbunden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher leukämische Zelllinien verschiedener Unterklassen der akuten lymphatischen Leukämie, Blasten aus peripherem Blut und Knochenmark, sowie

Urinproteine von Patienten auf ihre Glykoprotein-zusammensetzung, d.h. auf Concanavalin-A-Rezeptoren, untersucht. Folgende Fragestellungen wurden dabei bearbeitet:

1. Bestätigen Vergleiche der Con-A-Rezeptorenmuster von Zelllinien und Blasten die Einordnung nach immunologischen Kriterien oder treten deutliche Unterschiede auf? Sind eventuell Rückschlüsse vom jeweiligen Glykoproteinstmuster auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten ALL-Klasse möglich?
2. Weist der Urin von Patienten mit ALL andere Con-A-Rezeptoren auf als Normalurin oder Urin von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankung? Wenn ja, lassen sich dann die neu aufgetretenen Glykoproteine auch bei Zelllinien oder Blasten nachweisen? Wie ändert sich die Ausscheidung dieser Proteine im Verlauf der Therapie?
3. Welche Mengen von Probenmaterial, d.h. welche Zellmengen, werden zur Erzielung auswertbarer Ergebnisse bei Gelelektrophorese und radioaktiver Markierung benötigt? Sind also Untersuchungen dieser Art gegebenenfalls den Patienten zumutbar?

Die Analyse der Urinproben dient der Suche nach Zellbestandteilen, die beim Zerfall der Blasten freigesetzt werden. Solche Zellbestandteile könnten während der Induktionsphase der Zytostase eine Abschätzung der Tumorzellmasse und damit der Prognose ermöglichen. Außerdem ließe sich anhand eines schnelleren oder langsameren Rückgangs der Ausscheidung

auf die zytostatische Sensitivität der Blasten schließen. Eventuell könnten auch Rezidive durch Kontrolle der Urinproteine früher erkannt werden.

2. Theorie

2.1. Änderungen des Zellglykoproteinmusters im Zusammenhang mit der malignen Entartung

Glykoproteine sind sowohl Bestandteile der Membransysteme im Zellinneren, als auch der Zellmembran. Ihre Kohlenhydratanteile wirken als antigene Strukturen, sie bilden z.B. die antigenen Determinanten der Blutgruppensysteme. Mit dem Prozeß der malignen Entartung kommt es zum Auftreten zellmembrangebundener "tumorspezifischer" Antigene bzw. dem Verlust physiologischer Zellantigene (BUDDECKE, 1978). Auch bei diesen "tumorspezifischen" Antigenen handelt es sich häufig um Glykoproteine und Glykolipide, deren Kohlenhydratgruppen ein gegenüber Normalzellen verändertes Oligosaccharidmuster aufweisen. Für den Verlust der Kontakthemmung bei Tumorzellen sind vermutlich ebenfalls diese Änderungen an der Membranoberfläche verantwortlich.

"Tumorspezifische" oder besser "tumor-assoziierte" Antigene mit Glykoproteinstruktur spielen heute bereits eine gewisse Rolle bei der Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen. So wird z.B. bei primären Leberzellkarzinomen und embryonalen Tumoren der Genitalorgane das α_1 -Fetoprotein bestimmt (WECK, 1982), bei Kolonkarzinomen CEA, das carcinoembryonale Antigen (STAAB et al., 1977). Bei der Differenzierung verschiedener Leukämieformen kommt ein weiteres "tumor-assoziiertes" Antigen, das "Common"-Typ-Antigen, zur Anwendung (GREAVES et al., 1975, zitiert nach SCHNEIDER, 1981). Ein Nachteil dieser

Methoden ist, daß diese Glykoproteine, die auch als Onkofetale Antigene bezeichnet werden, während der Embryonal- und Fetalzeit und in der Neugeborenenperiode physiologischerweise vorkommen. Sie sind also nicht im eigentlichen Sinne "tumorspezifisch", sondern stellen Bestandteile undifferenzierter Zellen dar. Diese Befunde haben zu der Hypothese geführt, daß maligne Entartung identisch mit einem Differenzierungsblock ist. Daraus folgt, daß es möglicherweise gar keine krebsspezifischen Antigene gibt, sondern lediglich Differenzierungsantigene, die nur in bestimmten Phasen der Ontogenese auftreten.

Das Auftreten onkofetaler Antigene weist also nicht immer auf das Vorliegen eines Tumors hin. So ergaben Untersuchungen auf α_1 -Fetoprotein und CEA 12% falsch positive Ergebnisse (BUDDECKE, 1977). Andererseits lassen sich diese Antigene aber auch nicht in jedem Fall bei Tumoren, bei denen sie üblicherweise auftreten, nachweisen, d.h. es gibt auch falsch negative Ergebnisse. Wegen der geringen Trefferquote können daher die onkofetalen Antigene nur bedingt für die Diagnostik herangezogen werden. Trotzdem ist die Suche nach weiteren solchen Antigenen sinnvoll, da sie z.B. wie CEA und α_1 -Fetoprotein bei der Verlaufskontrolle von Tumoren eingesetzt werden könnten. Die biochemische Untersuchung der Glykoproteinemuster maligne entarteter Zellen führt vielleicht zu einer Ergänzung der Erkenntnisse über die Antigenstruktur dieser Zellen, die hauptsächlich durch immunologische Untersuchungen gewonnen wurden, und zur Entdeckung weiterer "tumor-assoziiertes" Antigene.

2.2. Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie

Nach der Kiel-Klassifikation, der heute gebräuchlichsten zytologischen Einteilung der Lymphome, wird die akute lymphatische Leukämie der Gruppe der lymphoblastischen Lymphome zugeordnet, die außerdem noch das T-Zellen-Mediastinallymphom, Burkitt-Lymphome und Burkitt-ähnliche Lymphome umfaßt. Die Kiel-Klassifikation beruht sowohl auf immunologischen Kriterien, d.h. der Zuordnung zur Gruppe der B- bzw. T-Zellen, als auch auf der Zellmorphologie, wobei ergänzend zytochemische Reaktionen wie die PAS-Reaktion, die Reaktion der sauren Phosphatase oder die Myeloperoxidasereaktion Anwendung finden.

Für das Abgehen von einer ursprünglich nur histologischen Einteilung der Lymphome sprechen wichtige Gründe. Die Einteilung war zwar für den Kliniker nützlich, da sich Korrelationen zwischen Prognose und Zellmorphologie ergaben, doch sie trug wenig zum Verständnis von Ursprung und Wesen der Lymphome bei, die ja als Störungen des "Zellverhaltens" aufzufassen sind (MAGRATH, 1981). Außerdem ergaben sich bei Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit dieser histologischen Diagnosen in verschiedenen Zentren nur selten Werte von mehr als 60% Übereinstimmung (LENNERT et al., 1978, zitiert nach MAGRATH, 1981). Ein Ersatz oder zumindest eine weitgehende Ergänzung des relativ subjektiven Einteilungsverfahrens durch objektivere immunologische und biochemische Methoden ist also wünschenswert.

Mit der Entdeckung verschiedener immunologischer Oberflächenmarker wurden bereits die ersten Schritte in

diese Richtung unternommen. Es handelt sich dabei zunächst um Membranrezeptoren, die eine Unterteilung der Leukämien in solche mit B- und solche mit T-Zelleigenschaften ermöglichten. Letztere werden durch den Schaferythrozytenrezeptor (E-R) nachgewiesen (LAY et al., 1971; JONDAL et al., 1972; zitiert nach SCHNEIDER, 1981). Bei diesem Rezeptor handelt es sich möglicherweise um ein Glykoprotein mit dem Mol.-Gew. 160 000, das sich bei der Gelelektrophorese auf normalen T-Zellen, nicht aber auf B-Zellen fand (ANDERSON et al., 1976). Die unterschiedliche Stabilität der von Lymphozyten und Erythrozyten gebildeten Rosetten erlaubt eine weitere Untergliederung in unreife und reife T-Zellformen.

B-Zelleigenschaften werden durch Oberflächenmembranimmunglobuline (SmIg) nachgewiesen (RAFF, 1971, zitiert nach SCHNEIDER, 1981). Falls man statt Membranimmunglobulinen intrazytoplasmatisches IgM findet, handelt es sich um Zellen, die der unmittelbaren Vorstufe zu reifen B-Lymphozyten entsprechen. Leukämien mit diesem Zelltyp werden als prä-B-Leukämien bezeichnet (VOGLER et al., 1978, zitiert nach SCHNEIDER, 1981).

Neben E-R und SmIg existieren noch weitere fakultative Membranrezeptoren auf den Leukämiezellen, die auch auf normalen Zellen vorkommen, so z.B. ein Rezeptor für das F_C -Fragment von IgG (F_C -R) und Komplementrezeptoren für C3 (C3-R), die auf normalen B-Lymphozyten ebenfalls nachweisbar sind (EDEN et al., 1973). F_C -R ist vermutlich ein Glykoprotein mit einem Mol.-Gew. von ungefähr 70 000 (DICKLER, 1976).

Leukämieformen, bei denen weder E-R noch SmIg auftreten, werden der Non-B-non-T-ALL zugerechnet, die neuerdings als C-ALL ("Common-type"-ALL) bezeichnet wird. Die C-ALL macht gut 2/3 der Fälle von akuter lymphatischer Leukämie aus und ist damit die wichtigste kindliche Leukämieform (COLLINS et al., 1974, zitiert nach RODT, 1976).

Weiterhin sind bestimmte Membranantigene bei der Klassifikation der ALL von Bedeutung. Sie unterscheiden sich von den Membranrezeptoren dadurch, daß ihnen bisher keine biologische Rezeptorfunktion zugeordnet werden konnte, und lassen sich nur mit Hilfe heterologer Antisera nachweisen. Zu diesen Membranantigenen zählen das B-Zell-Alloantigen (HLB-A, "Ia-like antigen"), das C-Typ-Antigen (C-ALL-A) und das menschliche Thymuslymphozytenantigen (HTLA).

Das B-Zell-Alloantigen ist aus zwei assoziierten, nicht kovalent gebundenen Glykoproteinen mit den Molekulargewichten 29 000 und 34 000 Dalton zusammengesetzt (SPRINGER et al., 1977). HLB-A ist während der ganzen B-Lymphozyten-Differenzierung von der lymphatischen Stammzelle bis zum reifen B-Lymphozyten nachweisbar und tritt auch bei Leukämiezellen auf, die diesen Differenzierungsstadien zugeordnet werden können (BILLING et al., 1976, zitiert nach SCHNEIDER, 1981). Auf Plasmazellen und in der T-Lymphozytenreihe nach Reifung der gemeinsamen B- und T-Vorläuferzelle wird es nicht mehr gefunden.

C-ALL-A ist ein glykosiliertes Polypeptid mit einem Mol.-Gew. von 100 000 (SUTHERLAND et al., 1978, zi-

tiert nach SCHNEIDER, 1981). Dieses Antigen weist ebenfalls keine Leukämiespezifität auf, sondern es tritt auch bei Zellen im "immunological rebound", d.h. während der Regeneration des Knochenmarks nach Absetzen einer zytostatischen Therapie, bei der "leukämoiden" Reaktion im Knochenmark von Säuglingen und in geringer Menge im embryonalen Knochenmark auf (GREAVES et al., 1980a und b, zitiert nach SCHNEIDER, 1981). Besondere Bedeutung bei der Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie kommt diesem Antigen deswegen zu, weil es in 65% der Fälle von Non-B-non-T-ALL nachgewiesen werden konnte (GREAVES et al., 1975, zitiert nach SCHNEIDER, 1981). Damit kann diese Leukämieform auch positiv durch das Vorhandensein eines Membranantigens definiert werden.

Durch Immunisation mit menschlichen Thymuslymphozyten wurde ein weiteres Antiserum gewonnen, das sich zur Einteilung der Leukämien eignet (RODT et al., 1976; BORELLA et al., 1977). Das auf diese Weise entdeckte menschliche Thymuslymphozytenantigen befindet sich auf Thymozyten, thymusabhängigen Lymphozyten und auf lymphoblastoiden Zellen vom T-Zelltyp, nicht aber auf solchen Zellen vom B-Zelltyp. HTLA war sogar bei bestimmten T-Zell-Leukämien bei denen Schaferythrozytenrezeptoren nur schwach ausgeprägt waren, deutlich nachzuweisen.

Unter Verwendung aller oben aufgeführten Marker ergibt sich also eine neue Unterteilung der akuten lymphatischen Leukämie in verschiedene Untertypen, nämlich C-ALL(1), C-ALL(2), C/T-ALL, prä-T-ALL, Thy-ALL, T-ALL, prä-B-ALL und B-ALL (THIEL et al., 1977, zi-

tiert nach SCHNEIDER, 1981; s. auch Tab. 1).

Ausgehend von der Annahme, daß die einzelnen Leukämieformen durch Anhalten der normalen Zelldifferenzierung auf verschiedenen Reifungsstufen entstanden sind, und aufgrund von Vergleichen mit der Verteilung immunologischer Marker auf normalen lymphatischen Zellen lassen sich Rückschlüsse auf die normale Entwicklung ziehen (THIEL et al., 1977; s. auch Abb. 1).

klin. Unterteilung	immunologische Untergruppe	Membranmarker							
		C-ALL-A	HLB-A	C3-R	F _c -R	HTLA	E-R ₃₇	E-R ₄	SmIg
C-ALL	C-ALL (1)	+	+						
	C-ALL (2)	+	+	+	+				
	C/T-ALL	+		+	+	+			
	prä-T-ALL			+	+	+			
	prä-B-ALL	+	+	+	+				
T-ALL	Thy-ALL			+	+	+	+		
	T-ALL					+		+	
B-ALL	B-ALL		+	+	+				+

Tab. 1: Einteilung der akuten lymphatischen Leukämie mit Hilfe von Membranmarkern (modifiziert nach THIEL et al., 1977)

C-ALL-A	C-Typ-Antigen	HTLA	menschliches Thymuslymphozytenantigen
HLB-A	B-Zell-Alloantigen	E-R ₃₇	Schaferythrozytenrezeptoren mit
C3-R	Komplementrezeptor für C3	E-R ₄	Rosettenbildung bei 37°C bzw. 4°C
F _c -R	Rezeptor für das F _c -Fragment von IgG	SmIg	Membranimmunglobuline

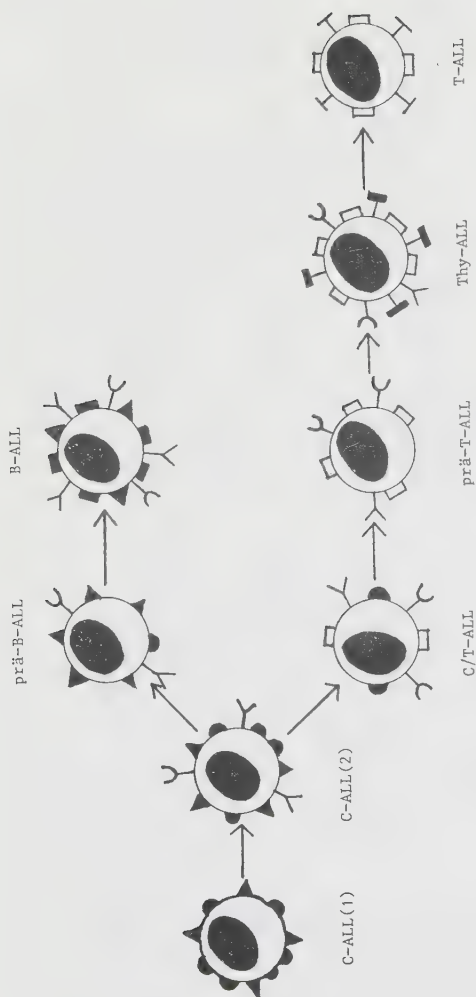


Abb. 1: Schematische Darstellung der frühen Entwicklungsstufen von B- und T-Lymphozyten. Den einzelnen Differenzierungsstufen ist jeweils die korrespondierende ALL-Untergruppe zugeordnet (modifiziert nach THIEL et al., 1977, und SCHNEIDER, 1981)

●	C-ALL-A	□	HTLA
Y	C3-R	T	E-R ₃₇
Y	Fc-R	T	E-R ₄
■	SmIg	▲	HLB-A

Abkürzungen s. Tab. 1

2.3. Proteinauftrennung und Molekulargewichtsbestimmung mit dem SDS-Gradientengelelektrophorese

Da es sich bei den meisten der in vorigen Kapitel beschriebenen Marker um Glykoproteine handelt, bieten sich natürlich auch biochemische Verfahren, die eine Proteinauftrennung und selektive Darstellung von Glykoproteinen ermöglichen, zur weiteren Analyse der leukämischen Zellen an. Der in dieser Arbeit angewandten Methode liegt das von LAEMMLI (1970) angegebene Elektrophoresesystem zugrunde. Es ist ein diskontinuierliches Trennsystem, d.h. Sammelgel und Trenngel unterscheiden sich sowohl im pH-Wert, als auch in der Porengröße. Dadurch wird die Ausbildung einer hoch konzentrierten Startzone am Übergang vom Sammelgel zum Trenngel erreicht und so bei der Elektrophorese eine größere Trennschärfe der Banden erzielt. Die Zugabe von SDS bewirkt zunächst durch die Aufbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Bindungen und Disulfidbrücken eine quantitative Lösung sonst relativ unlöslicher Proteine. Durch Bindung von SDS an die Proteinmoleküle werden die ursprünglichen Ladungsunterschiede fast völlig aufgehoben, und alle Proteine erhalten eine negative Ladung (SHAPIRO et al., 1967). Es werden SDS-Protein-Komplexe gebildet, die im gesättigten Zustand in Abhängigkeit von der Konzentration an SDS-Monomeren eine definierte Menge an SDS pro g Protein enthalten (REYNOLDS und TANFORD, 1970). Durch die Bildung dieser Komplexe bekommen die Proteine hydrodynamische Eigenschaften, die von der ursprünglichen Länge der Aminosäurekette und damit ebenfalls vom Molekulargewicht abhängen. Da außerdem die Ladung pro Masseneinheit Protein annähernd konstant ist, ergibt sich eine Abhängigkeit der elektrophoretischen

Beweglichkeit vom Molekulargewicht. Somit ist die Möglichkeit gegeben, die SDS-Gradientengel-Elektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen zu verwenden (WEBER und OSBORNE, 1969).

2.4. Struktur und Eigenschaften von Concanavalin-A

Concanavalin-A (Con-A), ein Lektin, das aus der Bohnenart *Canavalia ensiformis* stammt, wird in jodiertem Zustand zur radioaktiven "Affinitäts-Markierung" von Glykoproteinen benutzt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Lektinen ist Con-A ein Protein ohne Kohlenhydratanteile. Bei einem pH-Wert von mehr als 6,7 wie bei den in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen besteht das Con-A-Molekül aus vier Untereinheiten mit einem Mol.-Gew. von je 27 000 (WANG et al., 1971; EDMUNDSON et al., 1971; zitiert nach SHARON und LIS, 1972). Pro Untereinheit sind eine Bindungsstelle für ein Monosaccharid bzw. für einen endständigen nicht-reduzierenden Zuckerrest und weitere Bindungsstellen für Ca^{2+} - und Übergangsmetallionen (z.B. Mn^{2+}) enthalten. Die Besetzung der letztgenannten Bindungsstellen ist Voraussetzung für die Reaktion des Lektins mit Zuckermolekülen (YARIV et al., 1968; AGRAWAL und GOLDSTEIN, 1968; zitiert nach SHARON und LIS, 1972).

Wie die übrigen Lektine zeigt auch Con-A eine ganze Reihe sehr unterschiedlicher Eigenschaften. Es wirkt auf bestimmte Tierarten toxisch, führt zur unspezifischen Agglutination von Erythrozyten (SUMNER und HOWELL, 1936, zitiert nach SHARON und LIS, 1972) und stimuliert Zellen, z.B. T-Lymphozyten, zur Mitose

(OLSON und LIENER, 1967; POWELL und LEON, 1970; NOVOGRODSKY und KATCHALSKI, 1971; zitiert nach SHARON und LIS, 1972). Außerdem agglutiniert Con-A bevorzugt leukämische Zellen und solche, die durch DNA-Tumroviren, Karzinogene oder Röntgenstrahlen transformiert wurden (INBAR und SACHS, 1969, zitiert nach SHARON und LIS, 1972). Alle diese Eigenschaften beruhen vermutlich auf der Reaktion mit Glykoproteinen der Zelloberfläche. Dabei besteht eine Spezifität des Lektins für bestimmte endständige Zuckerreste, nämlich für α -D-Glucose, α -N-acetyl-D-Glucosamin, α -D-Mannose, β -D-Fructose und α -D-Arabinose. Die Wechselwirkung zwischen den beiden letztgenannten Kohlenhydraten und Con-A ist allerdings etwas schwächer (GOLDSTEIN et al., 1965; SMITH und GOLDSTEIN, 1967; zitiert nach SHARON und LIS, 1972; s. auch Abb. 2).

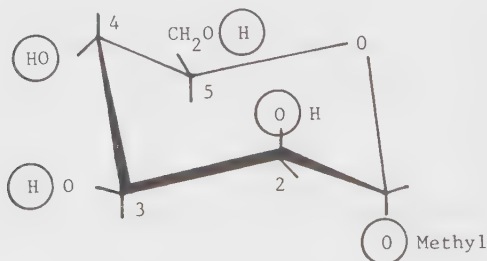


Abb. 2: Methyl- α -D-Mannopyranosid
Gruppen, die mit dem Con-A-Molekül in Interaktion treten, sind durch einen Kreis markiert. (nach SHARON und LIS, 1972)

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Ganzzellextrakte von normalen peripheren Lymphozyten, von durch Phytohämagglutinin-Stimulierung gewonnenen Lymphoblasten, von Thymozyten, leukämischen Zelllinien und peripheren Blasten, sowie lyophilisierte Urinproben wurden freundlicherweise von Dr. SCHNEIDER und Dr. HERZOG aus der Universitäts-Kinderklinik Erlangen zur Verfügung gestellt. Die normalen Lymphozyten, sowie die Lymphoblasten stammen von gepoolten Spendern und wurden von Biotest, Frankfurt, bezogen. Weitere Angaben zu den oben aufgeführten Proben sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Eigene Zellaufschlüsse erfolgten mit Triton X-100, spezialgereinigt, von der Firma C. Roth, Karlsruhe.

Zur Jodierung von Concanavalin-A wurden folgende Chemikalien benutzt:

^{125}J -Iodine von Radiochemical Centre Amersham, England, Concanavalin-A von Sigma, St. Louis, Mo., USA, Glucose-Oxidase (aus Schimmelpilzen), Charge-Nr. 1399333, und Lactoperoxidase (aus Kuhmilch), Charge-Nr. 1270316, von der Firma Boehringer, Mannheim.

Für die SDS-Gelelektrophorese bzw. zur Herstellung von Auftragslösungen, Puffern, Färber und Entfärber

Diagnose	Linie	Membranmarker					Herkunft
		E-R	SmIg	HTLA	HLB-A	C-ALL-A	
C-ALL	KM-3	-	-	-	+	+	SCHNEIDER, 1981
C-ALL	REH	-	-	-	+	+	ROSENFELD et al., 1977
C-ALL	RU-3	-	-	-	+	+	SCHNEIDER, 1981
C-ALL	MH-3	-	-	-	+	+	SCHNEIDER, 1981
(prä-B-ALL)							
C-ALL	N-ALL	-	-	-	+	+	MIYOSHI et al., 1977
T-ALL ^a	JM	+	-	+	-	-	SCHWENK und SCHNEIDER, 1975
T-ALL	T-ALL	+	-	+	-	-	MIYOSHI et al., 1977
T-ALL	Molt-4	-	-	+	-	-	MINOWADA et al., 1972
T-ALL	(CCRF-) CEM	-/+	-	+	-	+	FOLEY et al., 1965
B-ALL	B-ALL	-	+	-	+	-	MIYOSHI et al., 1977

Tab. 2: Herkunft und Membranmarker der untersuchten Zelllinien

SmIg Membranimmungsglobuline
E-R Schafererythrozyten-Rezeptor
HTLA menschliches Thymuslymphozyten-Antigen
HLB-A B-Zell-Alloantigen ("Ia-like antigen")
C-ALL-A C-Typ-Antigen

a etabliert aus Zellen eines Patienten nach
leukämischer Umwandlung eines malignen
Lymphoms

Patient	Membranmarker		Diagnose
	E-R	SmIg	
Sc.	0%	-	C-ALL
Wb.	5%	< 5%	C-ALL
Wü.	-	< 5%	T-ALL
D.E.	56%	26%	C-ALL
K.M.	11%	< 5%	C-ALL

Tab. 3: Immunologische Untersuchungsergebnisse bei Patienten, von denen Blastenpräparationen bzw. Urinproben untersucht wurden (nach persönlicher Mitteilung von Dr. HERZOG, Universitäts-Kinderklinik, Erlangen)

wurden verwendet:

Acrylamid, reinst, N, N, N', N'-Tetramethyläthylen-diamin, reinst, und Dodecylsulfat-Na-Salz, reinst, von Serva, Heidelberg,
N, N' - Diallyltartardiamide, Electrophoresis Purity Grade, von BIO-RAD Laboratories, Richmond, USA,
Ammoniumperoxidisulfat und 2-Mercaptoaethanol, reinst, p.a.-Qualität, von C. Roth, Karlsruhe,

Glycerol 99%, Glycin, p.a.-Qualität, und Coomassie Brilliant Blue R.C.I, 42660 von Sigma,
Natriumchlorid, Tris (hydroxymethyl) aminomethan, di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat von Merck, Darmstadt, jeweils in p.a.-Qualität.

Als Markenproteine zur Molekulargewichtsbestimmung wurden SDS-Page Molekular Weight Standards high (Mol.-Gew.-Bereich 250 000 bis 40 000) bzw. low (Mol.-Gew.-Bereich 100 000 bis 10 000) von BIO-RAD Laboratories verwendet.

Für die Autoradiographien wurde Kodak No-Screen Film NS-2T benutzt.

3.2. Methoden

3.2.1. Ganzzellextrakte mit Natriumdodecylsulfat

Die im folgenden beschriebene Präparation primärer Zellen und Zelllinien erfolgte in der Universitäts-Kinderklinik Erlangen und wurde der Arbeit von SCHNEIDER (1981) entnommen. Jeweils 20-100 µl gewaschenen Zellsediments wurden mit 0,5-2 ml 2%iger SDS-Lösung homogenisiert und 1 Stunde bei 100 000 g ultrazentrifugiert. Bei einigen polyploiden Zelllinien mit großen Kernen ergab sich ein deutliches Sediment, das verworfen wurde. Alle übrigen Zellen lösten sich nahezu ohne sedimentierbaren Rückstand in der SDS-Lösung auf. Die auf diese Weise gewonnenen Ganzzellextrakte wurden bei -80° C eingefroren oder gleich zur Elektrophorese weiterverwendet.

3.2.2. Ganzzellextrakte mit Triton X-100

Zellen der leukämischen Zelllinien Molt-4 bzw. EU-1 wurden nach der Ernte 2x im Kulturmedium ohne Serum gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml bestimmt, nachdem das Pellet nach dem letzten Waschvorgang in einer definierten Menge des Mediums suspendiert worden war. Die Suspension wurde aufgeteilt und die einzelnen Teile wurden in Eppendorf-Caps abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit etwa gleichem Volumen Triton-X-100-Puffer versetzt und gründlich

mit einem Whirl-Mix gemischt. Nach 15-minütigem Stehen bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Umschütteln wurden die Ansätze 5 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, um ungelöste Zellreste zu beseitigen. Der Überstand wurde entweder sofort für die Gelelektrophorese weiterverwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

Triton-X-100-Puffer: 1% Triton X-100 in 10 mM Tris-HCL; pH 7,5

3.2.3. Aufarbeitung der Urinproben

Die Aufarbeitung der 24-Stunden-Urine wurde ebenfalls in der Universitäts-Kinderklinik Erlangen durchgeführt (SCHNEIDER, 1981).

Die Urine wurden unter Zusatz von 200 mg/l Natriumazid und 10 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid gesammelt und durch ein Blauband Papierfilter filtriert. Die Konzentration des Urins auf ca. 100 ml und die anschließende Dialyse des Konzentrats mit 2-3 l bidestilliertem Wasser erfolgte in einem Amicon DC-2 hollow fiber Ultrafiltrationsgerät. Das Ausschlußmolekulargewicht der Filtrationspatrone war 10 000 d. Das Dialysat wurde durch einen Membranfilter mit einer Porenweite von 0,45 filtriert und lyophilisiert, das Lyophilisat in destilliertem Wasser aufgenommen und an Sephadex G-25 (40x2,6 cm) von niedermolekularen Substanzen gereinigt. Das im Ausschlußvolumen enthaltene Protein wurde lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4. Jodierung von Concanavalin-A mit ^{125}J -Jodid

Die Jodierung erfolgte in Anlehnung an die von BRAMWELL und HARRIS (1978) beschriebene Methode.

10 mg Concanavalin-A wurden zunächst mit 100 μl PBS-Glucose versetzt und unter leichtem Schwenken vermischt. Anschließend wurden noch einmal 100 μl PBS-Glucose zugegeben und wieder gemischt. Das Con-A löste sich dabei nicht ganz, sondern bildete eine gelbliche Suspension. Die Glucosezugabe erfolgte, um die Bindungsstellen für Glucose zu schützen, die für die spätere Markierung der Glykoproteine wichtig sind und die ebenfalls Tyrosinreste, d.h. Angriffspunkte für die enzymatische Reaktion, enthalten könnten.

Als nächstes wurden 125 μg Lactoperoxidase und 10 μg Glucose-Oxidase zugegeben und dann im Abzug 10 μl ^{125}J -Jodid, was einer Aktivität von 0,5-1 mCi entsprach.

Während der 25-minütigen Reaktionszeit wurde der Ansatz 2-3 mal geschwenkt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,2 ml eiskalter PBS-Glucose gestoppt und das Protein durch 1,5 ml eiskalte gesättigte Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration ca. 50%) ausgefällt. Anschließend wurde der Ansatz in einer 6L-Zentrifuge 15 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum radioaktiven Abfall gegeben. Das Pellet wurde erneut in 1 ml bidest. Wasser und 1,5 ml Ammoniumsulfatlösung suspendiert und wieder in gleicher Weise abzentrifugiert. Der Überstand kam zum radioaktiven Abfall, während das Pellet in 2 ml PBS-NaCl gelöst

wurde. 2 x 2 μ l dieser Lösung wurden mit Dioxan-Scintillator versetzt, um Aktivitätsverluste durch den folgenden Filtrationsschritt feststellen zu können.

Die restliche $^{125}\text{J-Con-A}$ -Lösung wurde mit 200 ml PBS-NaCl vermischt und über zwei Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 6) filtriert. Vom Filtrat wurden wieder zweimal 20 μ l mit Dioxan-Scintillator versetzt und dann zusammen mit den vor der Filtration entnommenen Proben im Scintillator gezählt. Der Aktivitätsverlust durch die Filtration betrug ungefähr 40%. Die $^{125}\text{J-Con-A}$ -Lösung wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei minus 20° C eingefroren. Aufgetaute Lösung wurde vor der Verwendung nochmals filtriert, da nach dem Einfrieren $^{125}\text{J-Con-A}$ -Niederschläge auftraten, die sich an der Oberfläche der Gele festsetzten und bei der Autoradiographie störten.

PBS: 0,14M NaCl + 2,7 mM KCL + 6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ +
1,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4

PBS-Glucose: PBS + 20 mM α -D-Glucose; pH 7,4

PBS-NaCl: PBS + 0,4 M NaCl; pH 7,4

3.2.5. SDS-Gradientengel-Elektrophorese

Gelherstellung

Zur Elektrophorese wurde eine Elektrophoresekammer der Firma BIO-RAD, Modell 220, benutzt (s. Abb. 3a und 3b).

Je zwei Glasplatten der Größe 14 cm x 18 cm, die an den Schmalseiten durch Abstandshalter von 0,75 mm Dicke

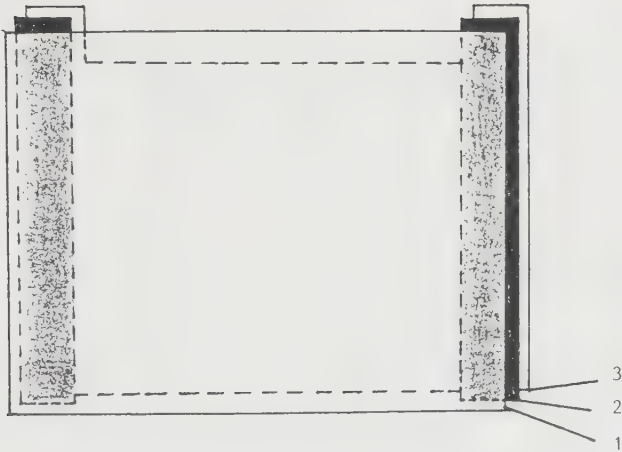


Abb. 3a: Anordnung von Glasplatten (1, 3) und Abstandshalter (2)

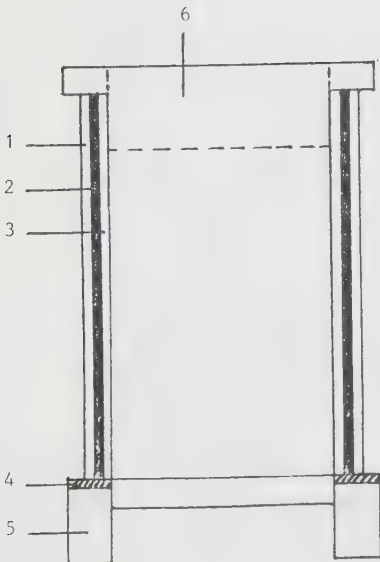


Abb. 3b: Seitenansicht der Elektrophoreseapparatur
1, 2, 3 s. Abb. 3a)
4 Gummidichtungsstreifen
5 Sockel
6 oberes Reservoir

Dichtungsstreifen und Sockel werden vor der Elektrophorese entfernt. Die Apparatur wird in eine mit Puffer gefüllte Wanne gestellt, die das untere Reservoir bildet.

getrennt wurden, wurden auf beiden Seiten der Apparatur auf Gummidichtungsstreifen gestellt und mit Schraubklammern befestigt. Anschließend wurden beide Seiten sowie der untere Rand noch zusätzlich mit Agarlösung abgedichtet.

Die beiden Trenngelgemische 1 und 2 hatten folgende Zusammensetzung:

Trenngel (Menge für 2 Gele):

	1	2
	(20% Acrylamid)	(7% Acrylamid)
Separationspuffer (184 g Tris-HCl ad 100 ml H ₂ O; pH 8,8)	3,75 ml	7,50 ml
Acrylamid-DATD-Lösung (50 g Acrylamid und 2 g DATD ad 100 ml H ₂ O)	6,00 ml	4,00 ml
Glycerin 99%	1,50 ml	---
Aqua bidest.	3,75 ml	18,50 ml
TMED	30,00 µl	50,00 µl
SDS 20%	160,00 µl	330,00 µl

Dem Gelgemisch 2 wurden 5 ml für das Sammelgel entnommen und mit 2 ml Aqua bidest verdünnt, so daß sich für das Sammelgel eine Acrylamidkonzentration von 5% ergab.

Der Start der Polymerisation erfolgte bei Gemisch 1

mit 25 μ l, bei Gemisch 2 mit 150 μ l und beim Sammelgel mit 75 μ l einer 10%igen Ammoniumperoxidisulfatlösung.

Die Lösungen wurden während des Gießvorganges eiskühlt, wobei immer zwei Gele gleichzeitig gegossen wurden. Lösung 2 wurde mit einer Pumpe in das Gefäß mit Lösung 1 befördert, wo die Lösungen mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt wurden. Eine zweite Pumpe beförderte dann das Gemisch mit derselben Geschwindigkeit wie die erste Pumpe durch zwei Kanülen (0,65 mm Durchmesser) zwischen die Glasplatten (s. Abb. 4). So ergab sich ein Gradientengel mit Konzentrationsgefälle von 7% Acrylamid (oben) und 20% Acrylamid (unten). Eine gleichmäßige Schichtung des Geles wurde dadurch erreicht, daß die Kanülenlangsam am Rand nach oben gezogen wurden, wobei sich die Spitzen immer etwas über dem Flüssigkeitsspiegel befanden. Das Trenngel wurde auf diese Weise bis zu einer Höhe von ca. 9 cm gegossen und dann vorsichtig mit etwa 0,5 ml Aqua bidest. überschichtet.

Nach einer Stunde war das Gel bei Raumtemperatur soweit polymerisiert, daß das überschichtete Wasser entfernt werden konnte. Anschließend wurde ein 0,75 mm dicker Kamm mit 5 mm breiten Zinken zwischen die Glasplatten geschoben, so daß der Abstand zwischen Geloberfläche und Unterrand des Kammes noch ca. 1 cm betrug. Der Kamm wurde dann in das Sammelgel einpolymerisiert, das bis zum Rand der Glasplatten eingefüllt wurde.

Die weitere Polymerisation erfolgte zunächst zwei

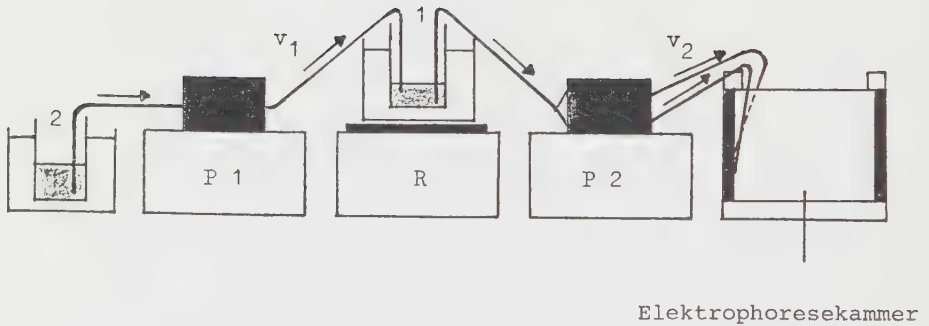


Abb. 4: Schematische Darstellung des Gießvorgangs
1, 2 Lösung 1 bzw. 2 in mit Eis gefüllter Wanne
P1, P2 erste bzw. zweite Pumpe
 v_1, v_2 Pumpgeschwindigkeit; $v_1 = v_2$
R Magnetrührer

Stunden bei Raumtemperatur und dann mindestens zwölf Stunden im Kühlraum, wobei die Gele mit Aluminiumfolie abgedeckt wurden.

Probenauftrag und Elektrophorese

Soweit die Proteinproben von leukämischen Zelllinien aus der Universitäts-Kinderklinik noch nicht in Auftragspuffer gelöst waren, wurden sie im Auftragspuffer auf eine Konzentration von ca. 1 mg Protein pro ml verdünnt.

Von den lyophilisierten Urinproben wurden je 2 mg in 100 µl Auftragspuffer gelöst.

Die Proteinmarkerlösungen wurden jeweils 1:20 mit dem Auftragspuffer verdünnt.

Alle Lösungen wurden vor dem Auftrag 20 Minuten bei 95° C im Wasserbad erwärmt und danach 3 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Die im Puffer gelösten Proben wurden bei -80° C eingefroren, da bei niedrigen Temperaturen ein schneller Zerfall der Proteine eintrat, der vermutlich durch in den Ganzzellextrakten und in den Urinproben enthaltene Enzyme katalysiert wurde.

Nach Entfernung der Kämme wurden die Taschen im Sammelgel zur Hälfte mit Laufpuffer gefüllt und die Proben und Proteinmarker mit einer Hamiltonspritze unterschichtet.

Nach der Füllung des unteren und des oberen Reservoirs der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer wurden Luftblasen, die sich an der Unterkante des Gels befanden, mit einer Spritze mit umgebogener Nadel entfernt.

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur, bei konstantem Stromfluß von 15 mA pro Gel bis zum Herauslaufen der Farbstofffront, was nach ca. 3 1/2 Stunden eintrat.

Auftragspuffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 + 2% SDS + 10% Glycerin + 0,001% Bromphenolblau + 5% 2-Mercaptoäthanol

Laufpuffer: 12 g Tris + 58 g Glycin + 2 g SDS ad 2 l Aqua bidest. aufgefüllt; pH 8,3

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung 1:2 mit Aqua bidest. verdünnt.

Färbung der Gele und Vorbereitung zur radioaktiven Markierung

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel über Nacht in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde es in Entfärber unter mehrmaligem Wechsel geschwenkt, bis der Untergrund soweit entfärbt war, daß die Proteinbanden deutlich hervortraten. Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Gele in feuchtem Zustand zur Dokumentation photographiert.

Färbelösung: 0,5 l Entfärber + 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R

Entfärber: 1 l Methanol + 1 l v.e. Wasser + 0,2 l
Essigsäure

Durch Schwenken in PBS-NaCl-Puffer (Zusammensetzung s. 3.2.2.) wurden die Gele anschließend unter mehrmaligem Pufferwechsel auf pH 7,4 gebracht, da der saure pH-Wert des Entfärbers sonst die Markierung mit $^{125}\text{J-Con-A}$ gestört hätte.

3.2.6. "Affinitäts-Markierung" der Glykoproteine mit $^{125}\text{J-Con-A}$

Die Gele wurden 24 Stunden in der $^{125}\text{J-Con-A}$ -Lösung geschwenkt und danach in PBS-NaCl-Puffer, wobei die Lösung 4-5x gewechselt wurde, bis in ihr keine Radioaktivität mehr nachweisbar war.

3.2.7. Trocknen der Gele

Vor dem Trocknen wurden die Gele noch einmal vorsichtig unter Wasser abgespült, um etwa noch oberflächlich anhaftende Con-A-Niederschläge zu entfernen. Auch die Plastikabdeckfolie des Trockners wurde gründlich gereinigt. Die Gele wurden dann im Geltdrockner von Hoefer Scientific Instruments, Modell SE 540, auf vorher angefeuchtetem Aquarellpapier (Schleicher & Schüll, Hahnemühle Aquarell-Bütten) 1 1/2 Stunden lang aufgetrocknet.

3.2.8. Autoradiographie

Zur Autoradiographie wurden die aufgetrockneten Gele mit Tesafilm auf den Röntgenfilm geklebt, in licht- und undurchlässige Tüten gesteckt und dann mit Bleiplatten beschwert. Die Filme wurden je nach der Aktivität der ^{125}J -Con-A-Präparation nach 2-6 Tagen entwickelt. Expositionszeiten von mehr als einer Woche führten zu Unschärfe der Bilder, die durch die bei längerer Auflagezeit zunehmende Bedeutung der Streustrahlung bedingt war.

Da durch das Auftrocknen der Gele und das damit verbundene Flachdrücken schon etwas von der ursprünglichen Trennschärfe verlorengeht, wurde versucht, mit Gelen in feuchtem Zustand, die in Frischhaltefolie eingewickelt waren, Autoradiographien herzustellen. Dabei entstand jedoch eine Art "Schleier" auf den Bildern, der wahrscheinlich durch radioaktive Partikel verursacht wurde, die sich während der Auflagezeit in dem die Gele umgebenden Flüssigkeitsfilm gelöst hatten.

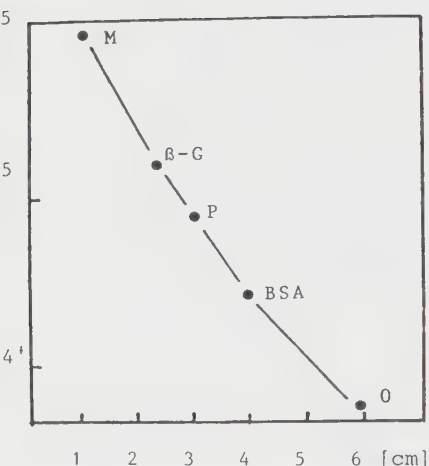
Aufgrund der methodisch bedingten leichten Unschärfe und wegen Verunreinigungen der Gele durch radioaktive Niederschläge konnte oft keine gute Qualität der Autoradiographie erzielt werden, was sich auch beim folgenden Bildmaterial zeigen wird.

3.2.9. Molekulargewichtsbestimmung der Glykoproteine

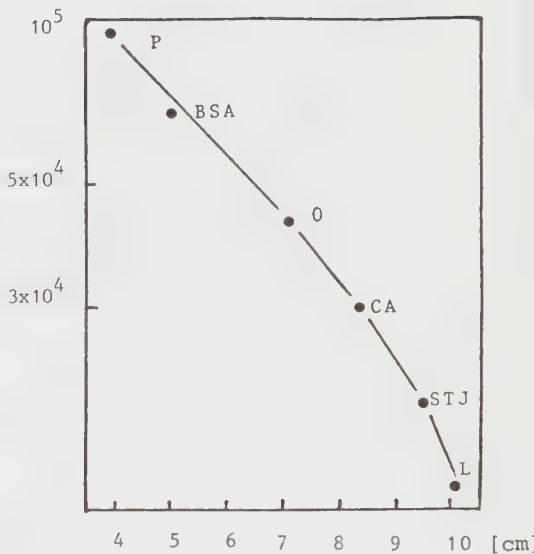
Es wurden zunächst jeweils drei verschiedene Autoradiographien der gleichen Probe zur Auswertung herange-

zogen. Mit Hilfe des bei jedem Gel mitgelaufenen Marker-Proteingemisches, dessen Bandenmuster auf die Autoradiographien übertragen wurde, wurden Eichkurven aufgestellt, aus denen die zugehörigen Molekulargewichte zu den einzelnen Proteinbanden ermittelt wurden (s. Abb. 5). Werte, die nicht im Molekulargewichtsbereich der Markerproteine lagen, wurden extrapoliert. Anschließend wurden Mittelwerte für die Mol.-Gew. entsprechender Banden auf den drei Autoradiographien errechnet.

-Gew. Mol.-Gew.



a)



b)

Abb. 5: Eichkurven zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine

a) Mol.-Gew.-Bereich 250 000 bis 40 000

b) Mol.-Gew.-Bereich 100 000 bis 10 000

Abszisse: Laufstrecke der Eichproteine in cm

Ordinate: Logarithmus der Molekulargewichte der Proteine

Eichproteine:

	Mol.-Gew.
Myosin (M)	200 000
β-Galactosidase (β-G)	116 500
Phosphorylase B (P)	94 000
Bovine Serum Albumin (BSA)	68 000
Ovalbumin (O)	43 000
Carbonic Anhydrase (CA)	30 000
Soybean Trypsin Inhibitor (STI)	20 100
Lysozyme (L)	14 300

4. Ergebnisse

4.1. Glykoproteinmuster nach "Affinitäts-Markierung" mit ^{125}J -Concanavalin-A

Nach Elektrophorese und Markierung mit ^{125}J -Con-A zeigten sich bei allen Proben auf den Autoradiographien 15-20 Glykoproteinbanden im Mol.-Gew.-Bereich zwischen 180 000 und 14 000. Bei längerer Laufzeit der Elektrophorese kam es teilweise zur weiteren Auftrannung von Glykoproteinen, die auf anderen Autoradiographien nur als eine Bande imponierten. Beim Vergleich mit Photographien der mit Coomassie-Blue gefärbten Gele zeigte sich, daß auf den Autoradiographien durch die "Affinitätsmarkierung" von Glykoproteinen mit ^{125}J -Con-A deutliche Unterschiede erkennbar werden, während die gefärbten Gele ein relativ einheitliches Bandenmuster aufweisen (s. Abb. 6). Die Bezeichnung der Banden erfolgte aufgrund des Mol.-Gew., so weist z.B. die Proteinbande 14 ein Mol.-Gew. von 14 000 auf.

4.1.1. Periphere Lymphozyten, durch PHA-Stimulierung gewonnene Lymphoblasten und Thymozyten

Als Kontrollzellen dienten periphere Lymphozyten, PHA-Lymphoblasten und Thymozyten (s. Abb. 7 und Tab. 4). Die peripheren Lymphozyten stammten ebenso wie die durch PHA-Stimulierung gewonnenen Lymphoblasten von gepoolten normalen Spendern. Die Thymoblasten wurden aus dem Thymus von Kindern gewonnen, die einer Herzoperation unterzogen wurden und keine Leukämie hatten. Durch Untersuchung dieser Zellen sollte das normale Banden-

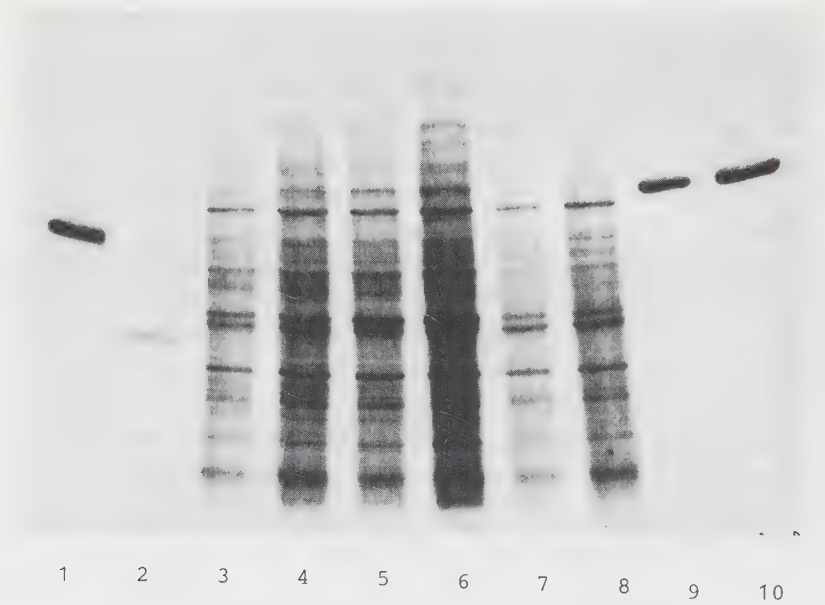


Abb. 6a: Drei verschiedene permanente Zelllinien
Gel nach Coomassie-Blue-Färbung

1, 2, 9, 10 Proteinmarker

3, 4 Molt 4

5, 6 Raji

7, 8 KM-3

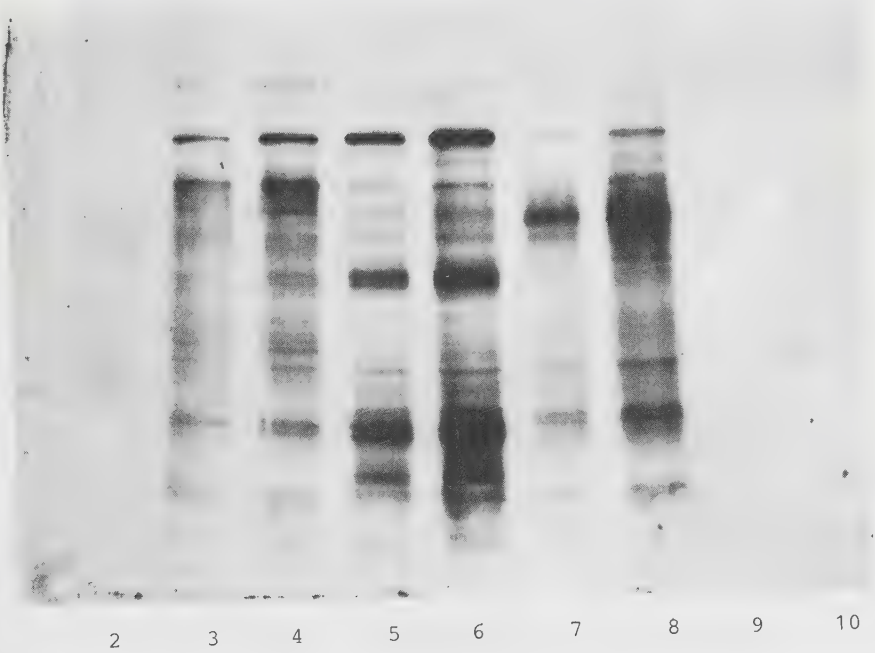


Abb. 6b: Drei verschiedene permanente Zelllinien
Autoradiographie nach "Affinitätsmarkierung"
von Glykoproteinen mit ^{125}J -Concanavalin-A

2, 9, 10	Proteinmarker
3, 4	Molt 4
5, 6	Raji
7, 8	KM-3

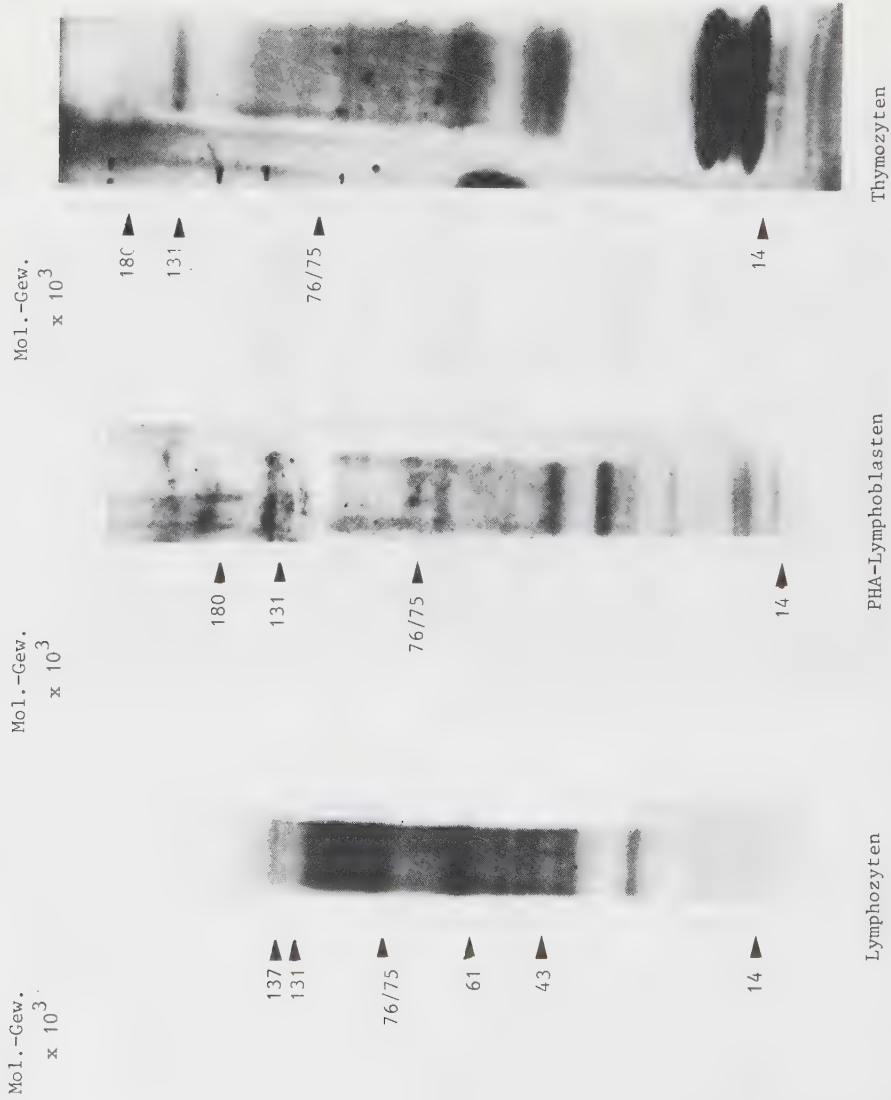


Abb. 7: Autoradiographien von Lymphozyten, PHA-Lymphoblasten und Thymozyten
Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

muster lymphatischer Zellen dargestellt werden und damit die Suche nach Änderungen im Glykoproteinemuster bei maligner Entartung ermöglicht werden.

Bei den Lymphozyten war eine Bande 180 nicht nachzuweisen. Im oberen Molekularbereich tritt aber bei ihnen ein Protein (Mol.-Gew. 137 000) auf, das sich weder bei Lymphoblasten und Thymozyten, noch bei Zelllinien oder Blasten zeigt. Gleichzeitig war die sonst deutlich sichtbare Bande 131 abgeschwächt. Die Bande 76/75 war allein bei den Lymphozyten stark markiert. Bande 61 ist eine weitere Hauptbande der Lymphozyten, die bei Lymphoblasten und Thymozyten vergleichsweise schwach ausgeprägt ist. Das Glykoprotein 43 tritt nur bei den peripheren Lymphozyten und bei C-ALL-Blasten (He., Sc.) auf. Die Lymphoblasten zeigen außer den schon beschriebenen Unterschieden keine weiteren Auffälligkeiten. Auch die Thymozyten unterscheiden sich mit Ausnahme der bereits erwähnten Banden kaum von Lymphozyten und Lymphoblasten.

Das Grundmuster dieser normalen lymphatischen Zellen wurde in Tab. 6 noch einmal wiedergegeben.

4.1.2. Leukämische Zelllinien

4.1.2.1. C-ALL-Linien

Untersucht wurden die Zelllinien KM-3, REH, RU-3, MH-3 und N-ALL (s. Tab. 2). Nach der bereits beschriebenen immunologischen Unterteilung der C-ALL (s. Abschnitt 2.2., Tab. 1) ist folgende Zuordnung möglich (SCHNEIDER, 1981):

Zelllinie	Untergruppe
KM-3	C-ALL (1)
RU-3	C-ALL (2)
MH-3	prä-B-ALL

Bei REH und N-ALL kann keine so genaue Zuordnung getroffen werden, da entsprechende immunologische Untersuchungen noch ausstehen. Bei KM-3 und RU-3 handelt es sich also um sehr frühe Differenzierungsstufen, während bei MH-3 die Entwicklung in Richtung B-Zellen schon erkennbar ist.

Die Untersuchung verschiedener C-ALL-Linien sollte klären, ob die Einteilung nach immunologischen Kriterien anhand der Con-A-Rezeptorenmuster nachvollziehbar ist.

Eine Zusammenstellung der Bandenmuster der einzelnen Linien erfolgt in Tab. 4, Abb. 8 zeigt eine Autoradiographie ihrer SDS-Gesamtzellextrakte.

Die Bandenmuster von KM-3 und REH ähneln sich stark, Unterschiede ergaben sich nur in der Intensität der Banden 61, 58 und 46. Das Muster von RU-3 unterscheidet sich bis auf das Auftreten eines Glykoproteins mit dem Molekulargewicht 180 000 nicht von denen von KM-3 und REH, aber die ^{125}J -Con-A-Markierung ist allgemein schwächer als bei ihnen. MH-3 weist ein ähnliches Glykoproteinmuster auf wie die B-ALL-Linie B-ALL (s. Abb 11), was besonders bei der Betonung von Bande 76 der Gruppierung 76/75 deutlich wird, die außerdem noch bei der T-ALL-Linie CEM und den peripheren Lymphozyten so stark markiert ist. Im Muster von N-ALL fällt besonders die Bande 79 ins Auge, die sonst bei keiner anderen Zelllinie nachzuweisen ist. Auch die Gruppierung der Banden

Mol.-Gew.
 $\times 10^3$

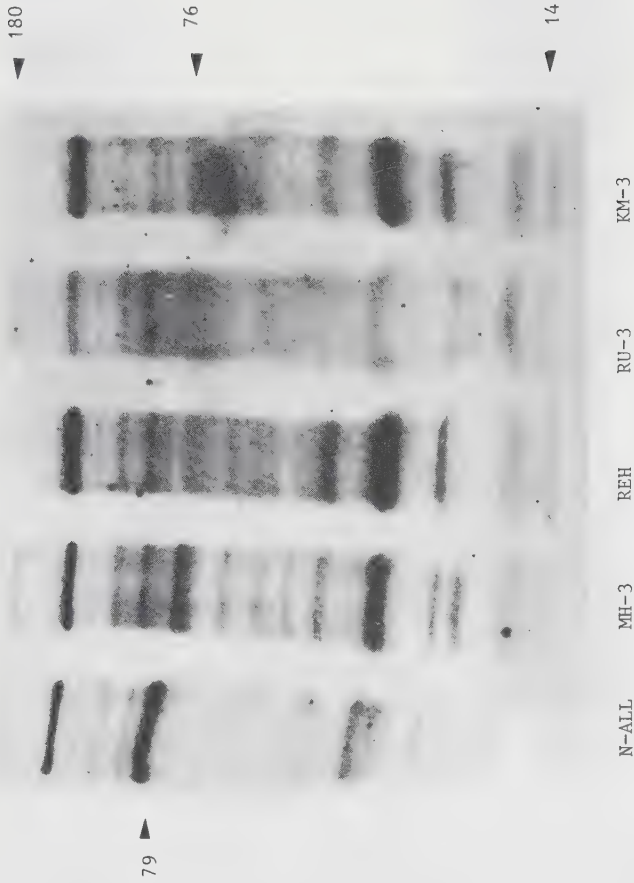


Abb. 8: Autoradiographie der C-ALL-Zelllinien.

Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

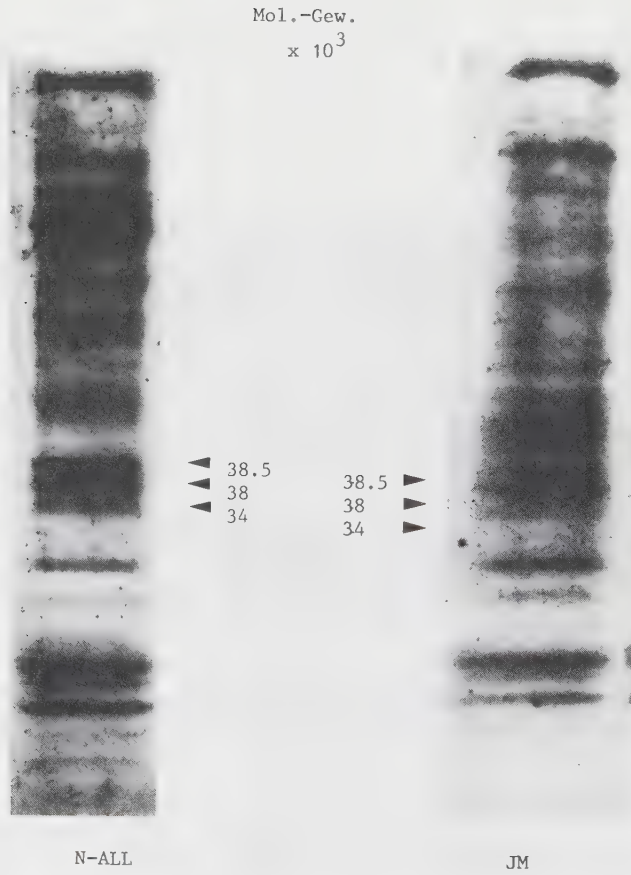


Abb. 9: Bandengruppierung 38.5/38/34 bei der
C-ALL-Linie N-ALL und der T-ALL-Linie JM

38,5, 38 und 34 mit Betonung der obersten Bande tritt bei den übrigen C-ALL-Linien nicht auf. Eine ähnliche Gruppierung zeigt sich allerdings bei JM, einer T-ALL-Linie (s. Abb. 9).

Zusammenfassend läßt sich also Folgendes feststellen:

1. REH weist große Ähnlichkeiten mit der Linie KM-3 auf.
2. Die Zelllinie RU-3, die dem nächsthöheren Grad der Differenzierung zuzuordnen ist, unterscheidet sich durch das Auftreten eines Glykoproteins mit dem Mol.-Gew. 180 000 von den beiden vorher genannten Zelllinien.
3. Die prä-B-ALL-Linie MH-3 zeigt bereits Ähnlichkeiten mit der Linie B-ALL.
4. N-ALL ähnelt andeutungsweise der T-ALL-Linie JM.

Die Bandenmuster der C-ALL-Linien wurden in Tabelle 6 noch einmal wiedergegeben.

4.1.2.2. T-ALL-Linien

Es wurden die Zelllinien JM, T-ALL, Molt-4 und CEM untersucht (s. Tab. 2). Bei JM handelt es sich um eine Linie, die aufgrund ihrer immunologischen Marker der T-ALL-Untergruppe Thy-ALL zugeordnet werden kann (SCHNEIDER, 1981; s. auch Tab. 1 und Abb. 1). Die Linien T-ALL, Molt-4 und CEM wurden noch nicht weiter klassifiziert. Alle diese Zelllinien lassen bereits eine Differenzierung in Richtung auf die T-Lymphozyten erkennen.

Auch die Untersuchung der Con-A-Rezeptorenmuster der

T-ALL-Linien sollte wieder die Übereinstimmung mit der immunologischen Einteilung überprüfen.

Einen Überblick über die einzelnen Bandenmuster geben Tabelle 4 und Abbildung 10.

Am Bild der Zelllinie JM fällt auf, daß bis auf die Bande 131 alle Glykoproteine ziemlich gleichstark markiert sind. Die Bande 38 ist nur sehr schwach angedeutet, die Gruppierung 38,5/38/34 ähnelt, wie bereits erwähnt, dem Muster, das bei N-ALL auftritt (s. Abb. 9). Bei T-ALL zeigen sich mehrere Auffälligkeiten. So tritt anstelle der Bande 180, die bei allen übrigen T-ALL-Linien deutlich sichtbar ist, eine Gruppe von 3 Banden (180, 160, 145) auf, wobei die Bande 160 betont ist. Bei einem Mol.-Gew. von 61 000 taucht eine etwas unscharfe, breite Bande auf, die in dieser Art nur noch in der Präparation peripherer Lymphozyten nachzuweisen ist. Molt-4 weist keine Banden auf, die nicht bei den anderen T-ALL-Linien auftreten. Bei der Betrachtung des Glykoproteinemusters von CEM zeigen sich erhebliche Unterschiede zu den übrigen T-ALL-Linien. Einige Banden (104, 51, 48, 37,5, 26,5) treten nur bei CEM auf, andere bei den übrigen Linien nachgewiesene Glykoproteine (100, 61, 58, 46, 44, 28) fehlen, und die Bande 76, die sonst nur noch bei den peripheren Lymphozyten, MH-3 und B-ALL stark betont war, ist ebenfalls deutlich sichtbar.

Das Grundmuster der T-ALL-Linien ist in Tabelle 6 dargestellt, wobei CEM wegen der oben erwähnten Abweichungen nicht miteinbezogen wurde, sondern extra aufgeführt wurde. Im Vergleich mit den C-ALL-Linien ergibt sich Folgendes:

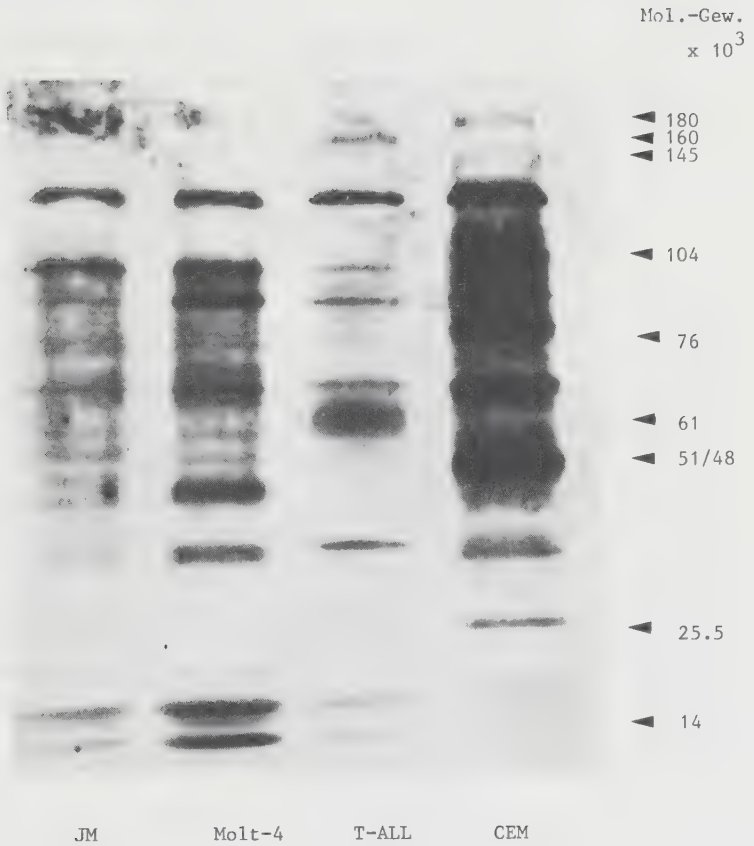


Abb. 10: Autoradiographie der T-ALL-Zelllinien.
Nur im Text besonders erwähnte Banden
sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

1. Molt-4 unterscheidet sich nur gering von RU-3.
2. JM und die C-ALL-Linie N-ALL weisen Ähnlichkeiten auf.
3. T-ALL zeigt Übereinstimmungen mit dem Bandenmuster peripherer Lymphozyten, die zu etwa 70% aus T-Lymphozyten bestehen.
4. Die Einordnung von CEM in die Gruppe der T-ALL-Linien wird durch das Glykoproteinemuster nach ^{125}J -Con-A-Markierung nicht bestätigt.

4.1.2.3. B-ALL-Linie

Wegen der großen Seltenheit von akuten lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ konnte hier nur eine B-Zelllinie, B-ALL, untersucht werden. Diese Zelllinie entspricht einer frühen Stufe der Entwicklung zu B-Lymphozyten (s. Tab. 1, Abb. 1 und Tab. 2). Das Bandenmuster von B-ALL ist in Abbildung 11 und Tabelle 4 wiedergegeben. Bei näherer Betrachtung fällt besonders die Ähnlichkeit mit der prä-B-ALL-Linie MH-3 auf, so z.B. die Betonung von Bande 76, die auch, wie schon erwähnt, bei der T-Zelllinie CEM nachzuweisen ist.

Mol.-Gew.
 $\times 10^3$

180



76



14

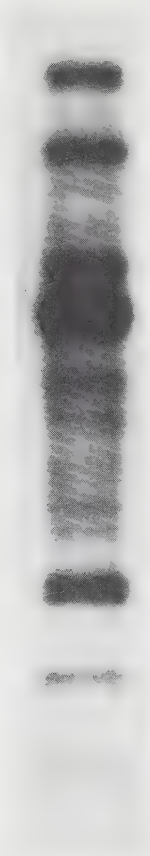


Abb. 11: Autoradiographie der B-ALL-Zelllinie B-ALL.
Nur im Text besonders erwähnte Banden sind
mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.1.2.4. Zusammenfassung

Im Großen und Ganzen bestätigten die Glykoproteinmuster die Einordnung, die bereits nach immunologischen Kriterien erfolgte. Es zeigt sich aber, daß Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien meist nicht durch das Auftreten völlig neuer Glykoproteine bedingt sind, sondern durch die unterschiedliche Betonung von Banden, die eine Art "Grundmuster" bilden (s. Tab. 6). Es handelt sich also in der Mehrzahl um quantitative Unterschiede und keine qualitativen. So läßt sich z.B. ein Glykoprotein mit dem Mol.-Gew. 76 000 überall außer bei den Thymozyten nachweisen, doch dieses Glykoprotein ist nur bei den peripheren Lymphozyten, MH-3, B-All und CEM in solcher Menge vorhanden, daß es als stark markierte Hauptbanden imponiert. Eine völlig neue Bande (Glykoprotein 79) zeigt sich bei N-ALL. Allein bei CEM traten so deutliche Unterschiede zum "Grundmuster" auf, daß diese Zelllinie in Tabelle 6 gesondert dargestellt wurde.

Bande	Normale lymphatische Zellen		C-ALL-Linien				T-ALL-Linien		P-ALL-Linie	
	Lymphozyten	Thymoblasten	W-3	P-3	W-3	W-3	T-ALL	P-ALL	P-ALL	P-ALL
180	-	+	-	+	+	+	(+)	+	+	++
160	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
145	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
137	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
131	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
104	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+
100	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
79	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
76	++	+	-/(+)	-/(+)	++	-/(+)	++	++	++	++
75	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-
67	++	+	+	+	+	+	++	++	++	+
61	++	+	+	+	+	+	++	++	++	+
58	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-/(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
38.5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
38	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
37.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 4: Schematische Darstellung der Bandenmuster von normalen lymphatischen Zellen und leukämischen Zelllinien. Die Bezeichnung der Banden bezieht sich auf das jeweils ermittelte Molekulargewicht, d.h. Bande 14 hat z.B. ein Mol.-Gew. von 14 000. Mit Klammer versehene Bandenpaare wurden nicht bei jeder Elektrophorese aufgetrennt.

-/(+) Bande auf manchen Autoradiographien nicht sichtbar
 (+) Bande schwach sichtbar
 + Bande sichtbar
 ++ Hauptbande

4.1.3. Blasten aus dem Blut bzw. Knochenmark von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie

4.1.3.1. C-ALL-Blasten

Untersucht wurden periphere Blasten der Patienten Ma., We., N., Sc. und Hu., sowie durch Knochenmarkspunktion gewonnene Blasten der Patienten He. und Wb. (s. Tab. 5 und Abb. 12). Da in der Klinik nur die Unterteilung in die Hauptgruppen C-All, T-ALL und B-ALL üblich ist, kann für die Blasten keine genauere immunologische Unterteilung angegeben werden. Soweit die Ergebnisse der Untersuchung auf Membranmarker zu ermitteln waren, sind sie in Tabelle 3 wiedergegeben. Beim Patienten Hu. wurde als Diagnose eine Mischform von C- und T-ALL angegeben. Wegen der im Folgenden aufgeführten Gründe wurde der Patient jedoch in dieser Arbeit der C-ALL-Gruppe zugeordnet.

Die Bandenmuster der Blasten wurden mit denen der Zelllinien und untereinander verglichen. Die Richtigkeit der Zuordnung zur C-ALL wurde dabei überprüft, soweit dies anhand der Glykoproteinemuster möglich war. Außerdem wurde versucht, die Blasten einzelnen Zelllinien mit ähnlichem Muster zuzuordnen.

Das Bild der Blasten "N." ist durch den Wegfall der Bande 180 besonders gekennzeichnet. Darin und auch in den übrigen Glykoproteinen stimmt es, abgesehen von einigen Intensitätsunterschieden, die vermutlich durch den Auftrag einer zu geringen Proteinmenge bedingt sind, mit den Mustern der Zelllinien KM-3 und REH überein (s. Tab. 4). Die Muster der Blasten der Patienten

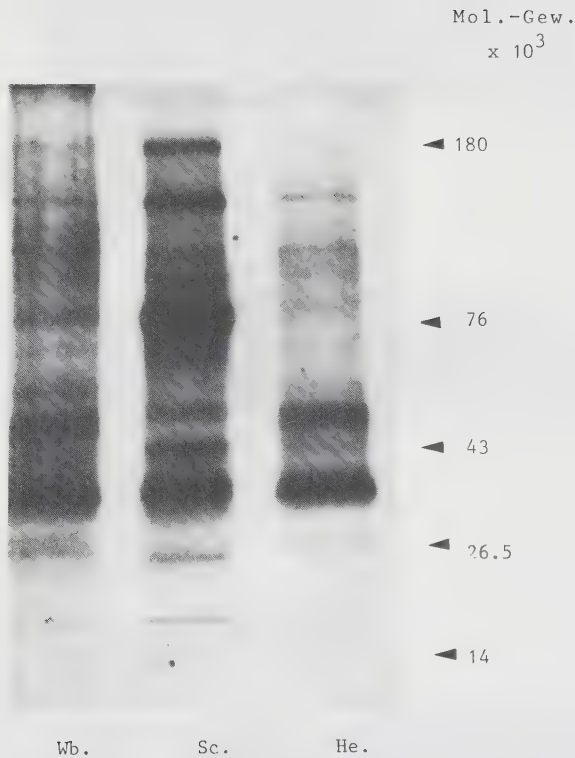


Abb. 12a: Autoradiographien der C-ALL-Blasten "Wb.", "Sc." und "He.".

Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

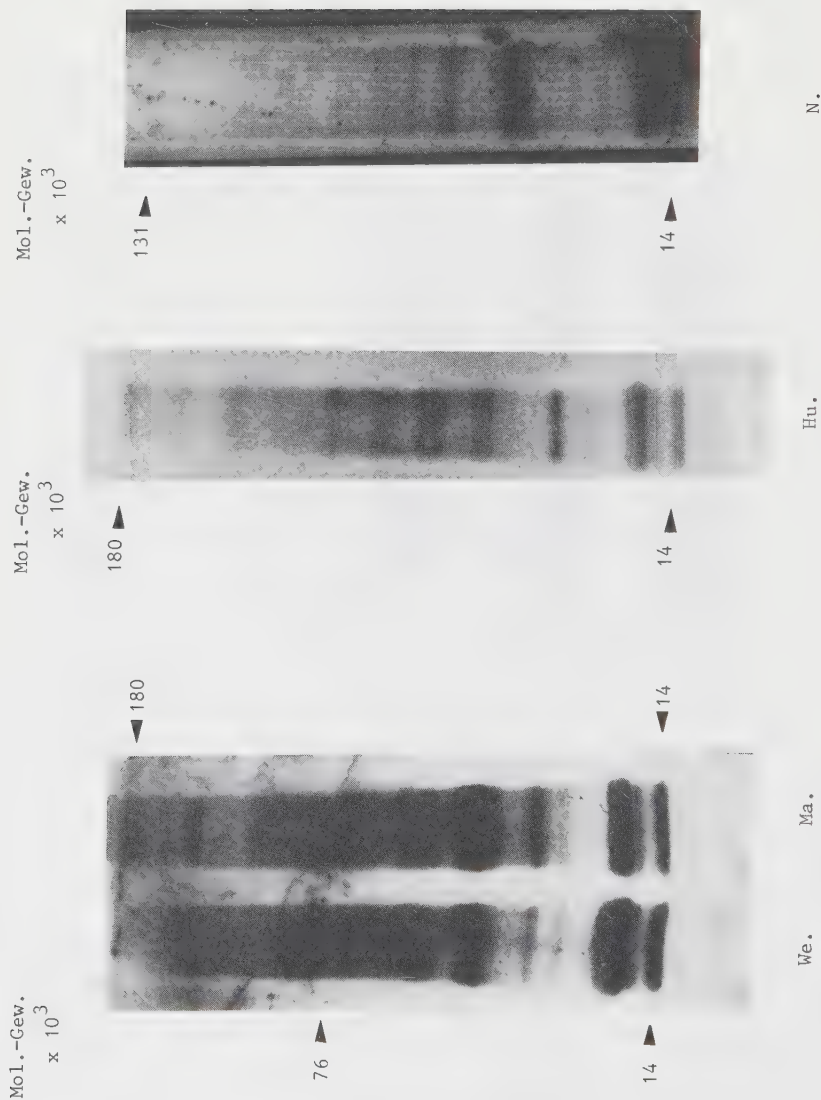


Abb. 12b: Autoradiographien der C-ALL-Blasten "We.", "Ma.", "Hu.", "N.". Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Hu. und Wb. entsprechen mit Ausnahme von Bande 61, die bei beiden fehlt, dem von RU-3. Bei den Zelllinien fehlt das Glykoprotein 61 nur bei CEM, doch es zeigt sich keine weitere Ähnlichkeit zwischen dieser Zelllinie und den Blasten "Hu." und "Wb.". Das Bild der Blasten des Patienten He. ähnelt dem von RU-3, aber es fehlt auch hier Bande 61 und es tritt wie bei den peripheren Lymphozyten ein Glykoprotein mit dem Mol.-Gew. 43 000 auf. Bei den Blasten "Sc." zeigt sich dieses Glykoprotein ebenfalls, und es lassen sich weitere deutliche Unterschiede zu den C-ALL-Linien feststellen, d.h. Wegfall der Glykoproteine 61 und 58, Auftreten einer Bande 51 bei gleichzeitigem Verschwinden der Gruppierung 46/44 und "Ersatz" der Bande 28 durch ein Glykoprotein mit dem Mol.-Gew. 26 500. Besonders stark markiert ist die Bande 76. Insgesamt ergibt sich also ein Bild, das etwa dem der T-ALL-Linie CEM ähnelt. Die Blasten des Patienten We. weisen gewisse Ähnlichkeiten mit den Zelllinien MH-3 bzw. B-ALL auf, wobei die Betonung des Glykoproteins 76 am meisten ins Auge fällt. "Ma." zeigt ein Bandenmuster, das etwa zwischen dem von "Hu." und dem von "Sc." einzuordnen wäre.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Muster der C-ALL-Blasten mehr oder weniger denen von C-ALL-, T-ALL- oder B-ALL-Linien entsprechen. Banden, die bei keiner Zelllinie aufgetreten waren, ließen sich bei den normalen lymphatischen Zellen nachweisen (vgl. Tab. 6). Eine Zuordnung der Blasten zu einzelnen Zelllinien aufgrund ähnlicher Glykoproteinmuster sieht folgendermaßen aus:

Zelllinien	C-ALL-Blasten
C-ALL: KM-3, REH RU-3	N. Hu., Wb., He. (?)
T-ALL(?): CEM	Sc.
prä-B-ALL	
bzw. B-ALL: MH-3, B-ALL	We.

"Ma." kann bei dieser Zuordnung nicht berücksichtigt werden, da sich keine deutlichen Übereinstimmungen mit einer Zelllinie ergaben. Obwohl beim Patienten Hu. die Diagnose "Mischform zwischen T- und C-ALL" lautete, entspricht das Bandenmuster doch eher dem der C-ALL-Linie RU-3, als dem Muster einer der T-ALL-Linien.

4.1.3.2. T-ALL-Blasten

Untersucht wurden SDS-Ganzzellextrakte der peripheren Blasten von drei Patienten (Mü., So., Wü.) mit akuter lymphatischer Leukämie vom T-Zell-Typ. Das genaue Ergebnis der Untersuchung auf Membranmarker war nur beim Patienten Wü. zu ermitteln (s. Tab. 3). Durch Vergleich mit den Glykoproteinmustern der Zelllinien und der bereits untersuchten C-ALL-Blasten sollte die immunologische Einteilung überprüft werden. Außerdem wurde der Versuch gemacht, die Blasten aufgrund von Übereinstimmungen einzelnen Zelllinien zuzuordnen. Die Bandenmuster nach radioaktiver Markierung sind in Abbildung 13 und Tabelle 5 wiedergegeben.

Die Blasten "Mü." weisen einerseits Ähnlichkeiten mit Molt-4 auf, so z.B. die starke Betonung von Bande 100, andererseits mit T-ALL, z.B. durch das Auftreten eines Glykoproteins 145, das allerdings nur schwach angedeutet ist. Eine eindeutige Zuordnung zu einer der T-Linien wird weiter dadurch erschwert, daß bei diesen Blasten eine Bande (Mol.-Gew. 70 000) auftritt, die sich sonst nirgends nachweisen läßt. Die Blasten des Patienten So. ergeben ein Bild, das dem von Molt-4 ungefähr entspricht, wenn man einmal von der allgemein schwächeren ¹²⁵J-Con-A-Markierung bei "So." absieht. Das Bandenmuster von "Wü." ähnelt dem von "So.", nur fehlt bei "Wü." die Bande 89, was ebenfalls wieder durch schwache Markierung verursacht sein dürfte. Eine Zusammenfassung der Glykoproteinemuster der T-ALL-Blasten ist in Tabelle 6 enthalten.

Zu einer T-Zelllinie (Molt-4) lassen sich also nur die Blasten der Patienten So. und Wü. zuordnen. Bei "Mü." trat ein völlig neues Glykoprotein (Bande 70) auf, das weder bei einer der Zelllinien, noch bei normalen lymphatischen Zellen nachzuweisen war. Da der Verdacht besteht, daß es sich hierbei nicht um eine akute lymphatische Leukämie handelt, sondern um eine myelomonozytische Leukämie (persönliche Mitteilung von Dr. HERZOG, Universitäts-Kinderklinik Erlangen), ist vielleicht eine Zuordnung zu einer T-ALL-Linie gar nicht möglich.

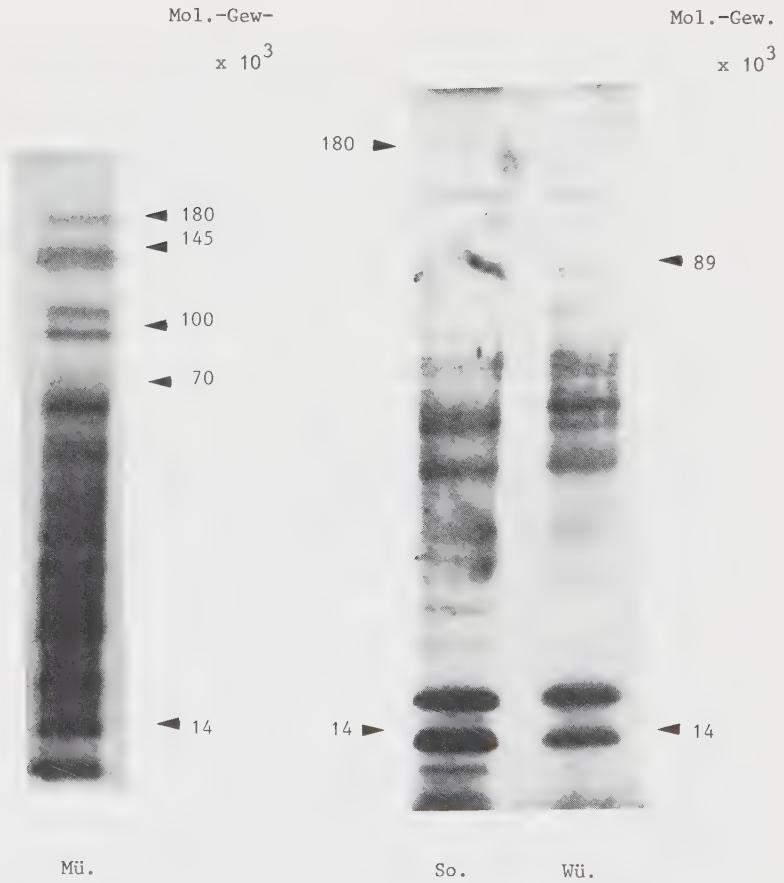


Abb. 13: Autoradiographien der T-ALL-Blasten "Mü.", "So.", "Wü."
Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Punkte	C-All-Plaston					T-All-Plaston			
	De.	Fl.	Ma.	N.	Sc.	Wb.	We.	Mü.	So.
180	+	+	+	-	+	+	+	+	+
142	-	-	-	+	-	-	-	(+)	-
121	+	+	+	+	++	+	+	++	++
100	+	+	+	-/(+)	+	+	+	++	(+)
82	+	(+)	+	-/(+)	++	+	++	(+)	(+)
76	-	-	-	-	-	-	-	+	-
67	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+
61	-	-	-	(+)	-	-	-	+	+
58	+	+	+	-	-	-	-	+	+
51	-	-	-	-	+	-	-	+	+
46	(+)	(+)	+	(+)	-	+	+	-	(+)
44	+	+	+	-	-	+	+	+	+
43	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-
38	++	++	++	(+)	++	++	(+)	+	+
34	+	+	+	+	-	+	+	+	+
28	-	-	-	-	+	+	+	+	+
26,5	(+)	+	+	+	(+)	-	-	+	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 5: Schematische Darstellung der Bandenmuster von C-All- und T-All-Plaston. Die Bezeichnung der Banden bezieht sich auf das jeweils ermittelte Molekulargewicht, d.h. Bande 14 hat z. B. ein Mol-Gew. von 14 000. Mit Klammer versehene Bandenpaare wurden nicht bei jeder Elektrophorese aufgetrennt.

-/(+) Bande auf manchen Autoradiographien nicht sichtbar
 (+) Bande schwach sichtbar
 + Bande sichtbar
 ++ Hauptbande

Pande	normale lymphat. Zellen	C-ALL		T-ALL		B-ALL	CEM
		Lirien	Plasten	Lirien	Blasten	Linie	
10	 L.PHA, Thy.	 PH-2, ML-2, N-ALL	 alle Blasten außer Sc.				
160	 p.L.			 T-ALL	 Mü.		
145				 T-ALL			
137							
131							
104							
89		 N-ALL			 Mü., Sc.		
73							
76							
75					 Mü.		
70							
67							
61							
58							
51)			 N.				
49)			 Ho., Mü., N., Sc.				
48)			 Na., Sc.				
46)			 He., Mü., N., Sc., Wg.	 JH, Folt-4			
44			 alle Blasten außer Sc.				
43	 p.L.	 N-ALL	 Ho., Sc.	 JH			
38.5							
37.5							
34							
28							
26.5			 alle Blasten außer Sc.				
25			 Sc.				
17							
14							

Tab. 6: Gegenüberstellung der Glykoproteinstreifen normaler lymphatischer Zellen, C-, T- und B-ALL-Linien und C- bzw. T-ALL-Blasten. Die Bezeichnung der Banden erfolgte wiederum nach dem jeweils ermittelten Molekulargewicht, d.h. Bande 14 hat z.B. ein Mol.-Gew. von 14 000.

— bei allen Proben einer Gruppe vorhandene Bande
 bei einer oder mehreren Proben einer Gruppe nachgewiesene Bande
 L.PHA durch PHA-Stimulation gewonnene Lymphoblasten
 p.L. periphere Lymphozyten
 Thy Thymozyten

4.1.3.3. Zusammenfassung

Da sich die Glykoproteinmuster der einzelnen Zelllinien mehr in quantitativer als in qualitativer Hinsicht unterscheiden, war eine Zuordnung der Blasten zu bestimmten Linien derselben ALL-Untergruppe nicht ganz einfach. Bei den C-ALL-Blasten wiesen die Zellen der Patienten Sc. und We. deutliche Unterschiede zu den C-ALL-Linien auf. Sie zeigten allerdings Ähnlichkeiten mit der fraglichen T-ALL-Linie CEM bzw. prä-B- oder B-ALL-Zelllinien. Bei den T-ALL-Blasten fiel "Mü." durch das Auftreten eines völlig neuen Glykoproteins auf. Aber in diesem Fall ist es ja fraglich, ob es sich überhaupt um eine lymphatische Leukämie handelt. Die Bandenmuster der übrigen Blasten bestätigten die bereits getroffene immunologische Klassifikation.

4.1.4. Glykoproteinausscheidung im Urin unter zytostatischer Therapie

Während der Zytostase werden Zerfallsprodukte der Blasten im Urin ausgeschieden. Durch elektrophoretische Auftrennung und radioaktive Markierung wurden im Urin Glykoproteine dargestellt und anschließend durch Vergleich mit den Bandenmustern von Zelllinien und Blasten überprüft, ob dort Glykoproteine mit dem gleichen Molekulargewicht nachzuweisen sind. Bei diesen Uringlykoproteinen könnte es sich also um Bestandteile der Leukämiezellen handeln.

Die Autoradiographien der Urinproben zeigten alle ein etwas verschwommenes Bandenmuster, was möglicherweise durch den beschleunigten Abbau der Proteine durch im

Urin vorhandene Proteasen bedingt ist. Die 10-15 Glykoproteinbanden erstrecken sich über einen Mol.-Gew.-Bereich von 200 000 bis 14 000.

4.1.4.1. Normalurin und Urinproben von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen als Kontrollproben

Gepoolter Normalurin und Urin von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen (Myokarditis, M. Crohn, primär chronische Polyarthritits) dienten als Kontrolle. Da selbstverständlich keine gesunden Probanden mit Zytostatika behandelt werden konnten, wurden Urine von Patienten untersucht, bei denen eine entzündliche Schädigung verschiedener Organsysteme vorlag, so z.B. eine Zerstörung von Zellen der Darmschleimhaut bei M. Crohn. Auf diese Art und Weise sollte die eventuell durch Zytostatikawirkung auf Zellen anderer Organe entstandene Glykoproteinausscheidung von derjenigen unterschieden werden, die durch Zerstörung von Leukämiezellen verursacht wurde.

Die jeweiligen Bandenmuster sind in Tabelle 7 und auf Abbildung 14 wiedergegeben.

Die ¹²⁵J-Con-A-Markierung bei Normalurin ist allgemein sehr schwach. Es treten nur einzelne Banden deutlicher hervor, so z.B. die Banden 79 und 30. Im Bereich zwischen diesen beiden Banden befindet sich der Hauptteil der markierten Glykoproteine, eine Verteilung, die sich auch bei den übrigen Urinproben zeigt. Bei den Patienten mit Myokarditis und M. Crohn kommt es zu einer vermehrten Glykoproteinausscheidung, was vor allem zur stärkeren Betonung von bereits im Normalurin nachge-

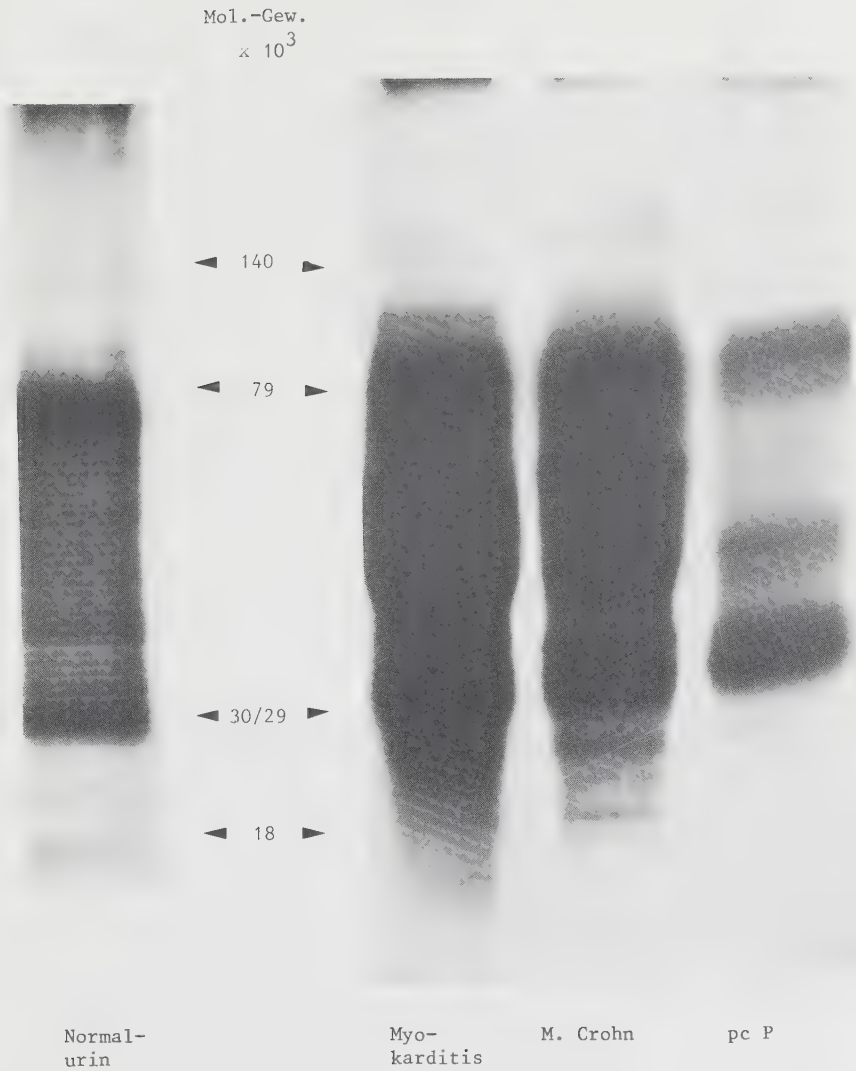


Abb. 14: Autoradiographien von Normalurin und von Urinproben von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen.

wiesenen Banden führt. Außerdem tritt im Mol.-Gew.-Bereich von 55 000 bei Myokarditisurin ein neues Glykoprotein auf, das auch bei M. Crohn im Urin zu sehen ist, allerdings nur als etwas unscharf begrenzte, schwächer markierte Bande. Im Myokarditisurin zeigt sich noch eine Besonderheit gegenüber Normalurin, nämlich das Auftreten einer Gruppierung 38/34 bei gleichzeitigem Verschwinden von Glykoprotein 33. Eine solche Bandengruppe tritt auch in den Urinproben von Leukämiepatienten und bei Zelllinien und Blasten auf, worauf im Folgenden noch genauer eingegangen wird. Das Bild bei primär chronischer Polyarthrititis entspricht ungefähr dem des Normalurins, doch es lassen sich noch weniger markierte Banden nachweisen, und die Gruppe 30/29 ist stärker betont als bei Normalurin.

4.1.4.2. Urinproben von Patienten mit C-ALL

Es wurden Urinproben von zwei Patienten (K.M., D.E.) mit C-ALL untersucht (s. Tab. 3). Dabei wurden bei K.M. Proben am 1., 3., 4. und 5. Tag der Zytostase entnommen, bei D.E. am 1., 3. und 6. Tag. Die Glykoproteinstmuster, die sich nach Elektrophorese und ^{125}J -Con-A-Markierung ergaben, sind in Abbildung 15 und Tabelle 7 zu sehen.

K.M. 1, die Probe vom 1. Tag der Zytostatikatherapie, weist noch einige Ähnlichkeiten mit dem Normalurin auf, doch es tritt im Mol.-Gew.-Bereich zwischen 60 000 und 50 000 eine Dreiergruppe von Banden auf, und die Gruppe 38/34 ist bereits schwach angedeutet. Diese Gruppierung wurde jedoch meistens nicht aufgetrennt, so daß nur eine Bande mit dem Mol.-Gew. 38 000 zu sehen ist. Ein Glykoprotein 14, das bei K.M. 1 vor-

handen ist, läßt sich ebenfalls bei Normalurin nicht nachweisen. Die Glykoproteinausscheidung nimmt an den folgenden Tagen zu, wie an der Verstärkung des Bandenmusters bei K.M. 3, K.M. 4 und K.M. 5 zu erkennen ist. Im Bereich zwischen 60 000 und 50 000 zeigt sich nur noch eine einzige breite Bande, die Glykoproteine 38/34 und 14 werden ebenfalls vermehrt ausgeschieden.

D.E. 1 weist als wesentliche Unterschiede zum Normalurin eine breite, stark markierte Bande im Mol.-Gew.-Bereich zwischen 79 000 und 94 000, sowie Glykoproteine mit dem Mol.-Gew. 55 000, 38 000 und 14 000 auf, wobei die Ausscheidung der beiden letztgenannten Glykoproteine an den folgenden Tagen zunimmt. Außer der allgemein vermehrten Glykoproteinausscheidung fällt bei D.E. 3 und D.E. 6 auf, daß von der breiten Bande zwischen 94 000 und 79 000 nur noch Glykoprotein 79 nachzuweisen ist.

Wenn man also die Glykoproteinemuster aller untersuchten Proben vergleicht, zeigt sich, daß nur zwei Banden ein Äquivalent bei den Zelllinien aufweisen und im Normalurin nicht auftreten, nämlich Bande 38/34 und Bande 14. Das Glykoprotein 14 ist auch bei keinem der Entzündungsurine nachzuweisen, während Bande 38/34 im Urin des Patienten mit Myokarditis ebenfalls auftritt. Es ist daher zu vermuten, daß zumindest Glykoprotein 14 aus zerstörten leukämischen Zellen stammt, was aber erst nach Isolierung und weitergehender Untersuchung dieses Proteins endgültig zu klären sein wird.

Mol.-Gew.
x 10³

38/54

14



K.M. 1 K.M. 3 K.M. 4 K.M. 5 RU-3 KM-3 N-ALL MH-3 REH

Abb. 15a: Autoradiographie der Urinproben des Patienten K.M. (Diagnose: C-ALL) vom 1., 3., 4. und 5. Tag der Xylostase im Vergleich mit C-ALL-Zelllinien (RU-3, KM-3, N-ALL, MH-3, REH).

Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Mol.-Gew.
x 10³

400
500

Mol.-Gew.
x 10³

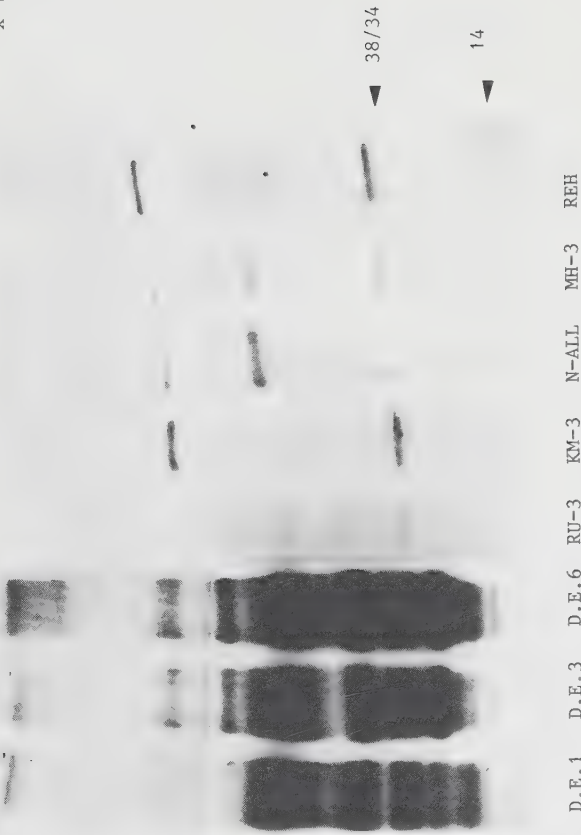


Abb. 156: Autoradiographie der Urinproben des Patienten D.E.
(Diagnose: C-ALL) von 1., 3. und 6. Tag der Zytostase im Vergleich
mit C-ALL-Zelllinien (RU-3, KM-3, N-ALL, MH-3, REH).
Nur im Text besonders erwähnte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Bande	Entzündungsurine		Urinproben von Patienten mit C-ALL								
	Normal- urin	Myokar- ditis	M. Crohn	pcp	V.N. 1	K.M. 3	K.M. 4	K.M. 5	D.E. 1	D.E. 3	D.E. 6
200	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
140	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
116	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
102	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
94	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
79	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
68	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
65	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 7: Schematische Darstellung der Bandenmuster von Normalurin, Entzündungsurinen und von Urinproben von Patienten mit C-ALL. Die Bandenbezeichnung erfolgte nach dem jeweils ermittelten Molekulargewicht, d.h. Bande 14 hat z.B. ein Mol.-Gew. von 14 000. Mit Klammer versehene Bandenpaare werden nicht bei jeder Elektrophorese aufgetrennt. Die Zahl in der Benennung der Urinprobe gibt den Entnahmetag an, so wurde z.B. Probe K.M. 1 am 1. Tag der Zytostase gewonnen.

- /(+) Bande auf manchen Autoradiographien nicht sichtbar
- (+) Bande schwach sichtbar
- ++ sehr breite Bande
- ++ Bande sichtbar
- ++ Hauptbande

4.2. Empfindlichkeit der Methode

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchung war es, die klinische Brauchbarkeit der angewandten Methoden festzustellen. Bei zwei leukämischen Zelllinien (Molt-4, EU-1) wurde nachgeprüft, welche Zellmengen zur Erzielung eines auswertbaren Bandenmusters nach Elektrophorese und radioaktiver Markierung benötigt werden. Bei der Präparation der Zellextrakte wurde Triton X-100 statt SDS verwendet, was zu einigen Unterschieden im Glykoproteinemuster führte, aber keine grundlegende Änderung der Methode darstellte (s. Abb. 16).

Bei einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen bei Molt-4 und 10^6 Zellen bei EU-1 ergab sich ein deutliches Bandenmuster. Von diesen Werten ausgehend läßt sich schätzen, welche Blutmenge man benötigt, um bei Patienten eine Untersuchung der Lymphozyten nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methode durchzuführen. Wenn man also zunächst eine Leukozytenzahl von 10 000 Zellen/ μ l annimmt und einen Verlust von 50% der Zellen bei der Ficoll-Gradient-Lymphozytenpräparation voraussetzt, enthält schon 1 ml Blut eine für die Untersuchung ausreichende Zellzahl, nämlich 5×10^6 Zellen. Selbst bei geringeren Leukozytenzahlen und eventuell noch höheren Verlusten bei der Lymphozytenpräparation werden Blutmengen benötigt, die 2-3 ml nicht überschreiten, d.h. für den Patienten bedeutet diese Untersuchung keine größere Beeinträchtigung.

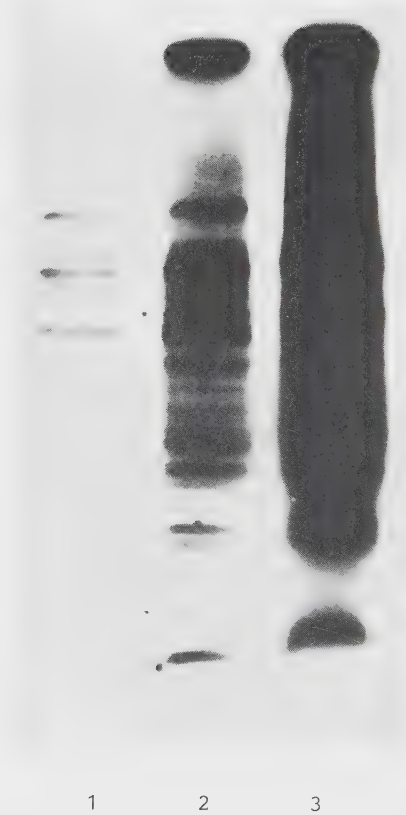


Abb. 16: Untersuchung der Empfindlichkeit der angewandten Methoden.

- 1 Molt 4, 10^6 Zellen
- 2 Molt 4, 3×10^6 Zellen
- 3 Molt 4, 10^7 Zellen

5. Diskussion

5.1. Glykoproteinmuster normaler lymphatischer Zellen, leukämischer Zelllinien und Blasten

Nach SDS-Gradientengel-Elektrophorese und radioaktiver Markierung der Glykoproteine mit ^{125}J -Con-A zeigten die einzelnen Proben reproduzierbare Bandenmuster, bei deren Vergleich sich herausstellte, daß die Unterschiede in der Glykoproteinzusammensetzung oft mehr quantitativer als qualitativer Natur sind. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der immunologischen Untersuchung von Membranmarkern leukämischer Zellen gemacht (THIEL et al., 1977). Dabei fand man bei Anwendung besonders empfindlicher Mikromethoden, daß die bisherige Vorstellung, leukämische Zellen verschiedener Untergruppen seien durch das Vorhandensein bzw. Fehlen bestimmter Marker charakterisiert, zu einfach war. Es zeigte sich, daß sich die einzelnen Zellen vielmehr in der Anzahl bestimmter Membranmarker unterscheiden, was bei den weniger empfindlichen qualitativen Methoden nicht erkannt wurde. Alle diese Zellen besitzen also eine Grundausrüstung an Oberflächenmarkern, deren zahlenmäßiges Verhältnis aber in den verschiedenen Stadien der Reifung, der Differenzierung oder des Zellzyklus variiert.

Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, daß alle lymphatischen Zellen, sowohl maligne entartete, als auch normale Zellen, ein gemeinsames "Grundmuster" von Glykoproteinen besitzen, das aus den folgenden Banden besteht:

Bande 180, 131, 100, 89, 76, 67, 61, 58, 46, 44, 38,

34, 28, 25, 17 und 14.

Die hier unterstrichenen Banden ließen sich überall nachweisen. Bei verschiedenen Proben fehlten zwar einzelne der oben aufgeführten Glykoproteine, doch das "Grundmuster" blieb immer erkennbar. Ob diese Glykoproteine allerdings tatsächlich fehlen oder ihre Menge nur unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden liegt, bleibt zu klären.

Bei einer Untersuchung von Membranpräparationen lymphoblastoider Zellen (RPMI 4265), vermutlich B-Zellen, durch SPRINGER und seine Mitarbeiter (SPRINGER et al., 1977) fanden sich 6 Polypeptide, die aufgrund ihrer Molekulargewichte einzelnen Glykoproteinen des "Grundmusters" entsprechen könnten. Ein Polypeptid mit dem Mol.-Gew. 105 000 ist vielleicht in der Bande 100 enthalten. Die Polypeptide mit den Molekulargewichten 44 000, 34 000, 29 000, 16 000 und 12 000 entsprechen eventuell den Banden 46/44, 34, 28, 17 und 14.

Neben dem oben beschriebenen Grundmuster treten bei verschiedenen Proben noch einzelne Glykoproteine auf, die für die entsprechenden Zellen typisch sind, wie z.B. die Bande 79 bei N-ALL.

Da sich quantitative Unterschiede mit der hier angewandten Methode nicht so einfach feststellen lassen wie solche qualitativer Art, wurde die Zuordnung noch nicht klassifizierter Zelllinien und Blasten zu Zelllinien mit bekannten Membranmarkern erschwert. Eine sichere Einteilung erfordert also noch weitere quantitative Untersuchungen der Glykoproteine, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konn-

ten. Eindeutige Zuordnungen aufgrund des Bandenmusters waren daher nur in wenigen Fällen möglich. So zeigten die Zelllinie REH und die Blasten des Patienten N. Übereinstimmungen mit der C-ALL-Linie KM-3, die der als C-ALL(1) bezeichneten immunologischen Untergruppe angehört. Der C-ALL(2)-Linie RU-3 ähnelten besonders die Blasten "Hu." und "Wb.". Bei den Blasten des Patienten Sc. treten mehrere Banden auf, die für die fragliche T-ALL-Linie CEM typisch sind. Bei dieser T-Zell-Linie traten im übrigen deutliche Widersprüche zwischen Glykoproteinemuster und immunologischer Einteilung auf. Es zeigten sich solche Abweichungen vom üblichen "Grundmuster", daß es fraglich erscheint, ob es sich bei CEM überhaupt um eine ALL-Linie handelt. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß CEM ursprünglich wirklich eine T-ALL-Linie war, deren Glykoproteinzusammensetzung sich dann im Laufe der Kultur änderte. So wurde bei dieser Zelllinie bereits der Verlust des Schaferythrozytenrezeptors während der Kultur festgestellt (ANDERSON et al., 1977).

Eine sichere Unterscheidung zwischen C-ALL, T-ALL und normalen lymphatischen Zellen war aufgrund des Bandenmusters nicht möglich, d.h. es konnten keine Rückschlüsse vom Glykoproteinemuster auf die Zugehörigkeit zu einer der genannten ALL-Klassen gezogen werden. Allein bei B-ALL und der prä-B-ALL-Linie MH-3 zeigte sich ein offenbar für B-Zellen typisches Verteilungsmuster der Proteine, wie z.B. das verstärkte Hervortreten der Bande 76.

Wenn man nun die einzelnen Proteinbanden näher betrachtet, lassen sich einige Überlegungen über ihre Bedeutung anstellen. Die Bande 180 tritt augenscheinlich nur

bei in Proliferation begriffenen Zellen ab einem gewissen Reifestadium auf, das dem der immunologischen Untergruppe C-ALL(2) entspricht. Für diese Annahme spricht auch das Vorhandensein bei Lymphoblasten, während die Bande bei Lymphozyten, die sich ja nicht in Proliferation befinden, fehlt. Bei den Zellen aus dem kindlichen Thymus, die eine hohe Mitoserate aufweisen, tritt die Bande 180 ebenfalls auf.

Beim Glykoprotein 160 könnte es sich aufgrund des Mol.-Gew. um den Schafer erythrozytenrezeptor handeln. Eine Bande desselben Mol.-Gew. wurde schon einmal bei T-Zellen, aber nicht bei B-Zellen nachgewiesen (ANDERSON et al., 1976) und daraus geschlossen, daß es sich dabei um diesen Rezeptor handeln könnte. Allerdings war diese Bande in der vorliegenden Arbeit bei den peripheren Lymphozyten, die bekanntlich zu etwa 70% aus T-Lymphozyten bestehen, nicht aufgetreten. Dieser Befund spricht also gegen die Identität des Glykoproteins 160 mit dem Schafer erythrozytenrezeptor.

Die Bande 100 könnte aufgrund des Mol.-Gew. dem C-ALL-Antigen entsprechen (SUTHERLAND et al., 1978), aber sie ist auch bei T-ALL-Zellen nachweisbar, die kein C-ALL-Antigen besitzen.

Bei der Bande 76 könnte es sich um ein Glykoprotein handeln, das nur bei B-Zellen vermehrt auftritt. Dieses Glykoprotein läßt sich zwar bei allen Proben nachweisen, doch es stellt eine Hauptbande von MH-3, der prä-B-ALL-Linie, von B-ALL, sowie von CEM, der fraglichen T-ALL-Linie, dar. Bei den peripheren Lymphozyten, die zu ungefähr 30% aus B-Lymphozyten bestehen, ist die Bande 76 deutlich erkennbar. Bei den Lymphoblasten,

die durch PHA-Stimulation von T-Lymphozyten entstanden sind, und bei den Thymozyten ist diese Bande schwächer bzw. kaum sichtbar.

Das vermehrte Auftreten eines Glykoproteins mit dem Mol.-Gew. 61 000 könnte im Zusammenhang mit der weitgehenden Ausdifferenzierung zu T⁺-Zellen stehen, da die entsprechende Bande bei der T-Zelllinie T-ALL und bei den peripheren Lymphozyten, die - wie schon erwähnt - zum größeren Teil aus T-Lymphozyten bestehen, besonders betont ist.

Die Banden 34 und 28 enthalten vielleicht die beiden Glykoproteine, aus denen das B-Zell-Alloantigen zusammengesetzt ist (SPRINGER et al., 1977). Dieser Vermutung steht allerdings entgegen, daß sich diese Banden bei den T-ALL-Linien und -Blasten ebenfalls nachweisen lassen, wenn auch z.T. schwächer markiert.

Um noch mehr Aufschlüsse über die Glykoproteinzusammensetzung leukämischer Zellen zu erhalten, sollten zunächst noch andere Zelllinien und vor allem die Blasten von weiteren Leukämiepatienten untersucht werden. Da wegen der hohen Empfindlichkeit der in dieser Arbeit angewandten Methoden nur sehr geringe Zellmengen bzw. Blutmengen benötigt werden, würden die letztgenannten Untersuchungen auch keine größere Belastung für die Patienten darstellen. Als nächster Schritt wäre z.B. die Isolierung einzelner interessanter Glykoproteine denkbar. Durch Herstellung spezifischer Antiseren ließe sich kontrollieren, ob bei verschiedenen Proben an gleicher Stelle auftretende Banden wirklich aus den gleichen Glykoproteinen bestehen. Solche neugewonnenen Antiseren könnten vielleicht auch zu einer Erweiterung und Verfeinerung der immunologischen Diagnostik der Leukämien führen.

5.2. Glykoproteinausscheidung im Urin

Bei der Untersuchung der Urinproben von Leukämiepatienten mit Hilfe von SDS-Gradientengel-Elektrophorese und ^{125}J -Con-A-"Affinitätsmarkierung" der Glykoproteine zeigt sich eine deutliche Zunahme des Glykoproteinanteils an der gesamten Proteinausscheidung während der Zytostase. Dabei treten bereits am 1. Tag der zytostatischen Therapie mehr und stärker markierte Glykoproteinbanden als im Normalurin auf. Ähnlich hohe Glykoproteinemengen im Urin lassen sich bei den Patienten mit entzündlichen Erkrankungen nachweisen.

Bei den Urinproben von Leukämiepatienten sind besonders die Banden 38/34 und 14 von Bedeutung, weil Glykoproteine gleichen Molekulargewichts auch bei den leukämischen Zelllinien und Blasten auftreten. Allerdings zeigt sich bei Myokarditis ebenfalls eine Bande 38/34 im Urin, wobei es sich aber um ein anderes Glykoprotein mit zufälligerweise demselben Mol.-Gew. handeln könnte. Die Bande 14 läßt sich weder bei einem der Entzündungsurine, noch im Normalurin nachweisen.

Da die Glykoproteine 38/34 und 14 aber auch bei normalen lymphatischen Zellen auftreten, könnten sie also bei Zerstörung dieser Zellen durch die Zytostatika freigeworden sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß sie hauptsächlich aus Blasten stammen, denn wie SCHNEIDER (1981) feststellte, fallen Maximum der Proteinausscheidung im Urin und größter therapiebedingter Blastenzerfall zusammen. Außerdem zeigte sich bei seinen Untersuchungen, daß die Eiweißmenge im Urin umso höher war, je größer die Blastenmasse bei Diagnosestellung war, und daß bei Reinduktionsbehandlung nach erreichter

Vollremission keine Erhöhung der Urinproteinausscheidung auftrat. Aus dem letzten Punkt läßt sich schließen, daß die zytostatische Therapie nicht durch Zerstörung von normalen Zellen oder Nierenschäden zu einer vermehrten Proteinausscheidung geführt hat.

Bei dem geringen Mol.-Gew. des Glykoproteins 14 bleibt im übrigen zu bedenken, daß es sich hierbei um ein Fragment eines anderen Proteins handeln könnte, das durch ein in den lymphatischen Zellen enthaltenes Enzym, das bei Zerstörung der Zellen freigesetzt wurde, abgespalten wurde. Da die Präparation von Ganzzellextrakten unter Verwendung von SDS ja auch eine Zellzerstörung darstellt, ist das Vorkommen dieses Glykoproteins im Zellextrakt durch während der Präparation abgelaufene proteolytische Vorgänge erklärbar.

Ob die im Urin nachgewiesenen Glykoproteine 38/34 und 14 nun tatsächlich Bestandteile lymphatischer Zellen sind, ließe sich nur mittels spezifischer Antiseren gegen diese Proteine eindeutig klären, mit denen dann ihr Vorhandensein in normalen lymphatischen und leukämischen Zellen überprüft werden könnte.

Ein Protein ("GP-3") mit dem Mol.-Gew. 9 500, das von SCHNEIDER (1981) im Urin von zwei Patienten mit C-ALL gefunden wurde und bei dem eine immunologische Verwandtschaft mit Normalurin-, Entzündungsurin- und Serumproteinen ausgeschlossen wurde, ließ sich in den hier untersuchten Urinproben nicht nachweisen. Auch auf den Autoradiographien von Zellextrakten lymphatischer Zellen war eine entsprechende Bande nicht zu erkennen.

In weiteren Untersuchungen bleibt zu klären, ob die Bestimmung der täglichen Ausscheidungsmenge der oben genannten Glykoproteine während der Zytostase und die Eliminationsdauer dieser Proteine sichere Hinweise auf die ursprüngliche Blastenmasse geben können, die einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt. Auf diese Weise könnte das bisherige Verfahren zur Bestimmung der Blastenmasse, nämlich klinische Untersuchung, peripheres Blutbild und Knochenmarkspunktion, erweitert und verfeinert werden. Die Ansprechbarkeit der Blasten auf die zytostatische Therapie könnte anhand des steileren oder flacheren Anstiegs der Ausscheidung der Glykoproteine 38/34 bzw. 14 im Urin kontrolliert werden, womit eine Aussage über einen weiteren Risikofaktor bei der ALL, die therapeutische Ansprechbarkeit, möglich würde. Es wäre außerdem zu überprüfen, ob entsprechende Glykoproteinbanden aufgrund des spontanen Zerfalls von Blasten auch vor Beginn der Zytostase im Urin der Patienten nachweisbar sind. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, bei dauernder Überwachung Rezidive rechtzeitig zu erkennen.

6. Zusammenfassung

Wichtige Eigenschaften von Tumorzellen, wie z.B. der Verlust der Wachstumskontrolle, sind mit Änderungen im Glykoproteinemuster der Zellmembran verbunden.

In dieser Arbeit wurden die Glykoproteine von permanenten Zelllinien, Blasten und des Urins von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie nach elektrophoretischer Auftrennung und Markierung mit ^{125}J -Concanavalin-A untersucht und Vergleiche mit der bereits existierenden immunologischen Klassifikation angestellt.

Es zeigte sich, daß allen untersuchten lymphatischen Zellen eine Art "Grundmuster" von Glykoproteinen gemeinsam ist, d.h. zwischen den Zellarten, auch zwischen normalen und maligne entarteten Zellen, bestehen eher quantitative als qualitative Unterschiede in der Glykoproteinzusammensetzung. Deswegen ist die Zuordnung zu einer bestimmten Untergruppe der akuten lymphatischen Leukämie aufgrund des Glykoproteinemusters allein nicht sicher möglich.

Bei der Untersuchung der Urinproteine fielen zwei Glykoproteine (Mol.-Gew. 38 000 bzw. 14 000) auf, die vermutlich aus zerfallenden Blasten stammen. Falls sich diese Annahme bestätigen sollte, wäre eine Nutzung dieser Glykoproteine für die Diagnostik und die Überwachung der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie denkbar.

Literaturverzeichnis

1. AGRAWAL, B.B.L., I.J.GOLDSTEIN:
Can. J. Biochem. 46: 1147 (1968)
2. ANDERSON, L.C., et al.:
Int. J. Cancer 17: 40-46 (1976)
3. ANDERSON, L.C., et al.:
Int. J. Cancer 20: 702 (1977)
4. BILLING, R.J., et al.:
J. exp. Med. 144: 167 (1976)
5. BORELLA, L., et al.:
J. Immunol. 118: 309 (1977)
6. BRAMWELL, M.E., H.HARRIS:
Proc. R. Soc. London B. 201: 87-106 (1978)
7. BROUET, J.C., et al.:
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 1250: 691 (1974)
8. BROWN, G., et al.:
Lancet II: 753 (1974)
9. BUDDECKE, E.:
Biochemie (1977) 485
W. de Gruyter Verlag, Berlin, New York
10. BUDDECKE, E.:
Pathobiochemie (1978) 362
W. de Gruyter Verlag, Berlin, New York
11. COLLINS, R.D., et al.:
Brit. H. Haematol. 26: 615-625 (1974)

12. DICKLER, H.B.:
Advance Immunol. 24: 167 (1976)
13. EDEN, A., et al.:
J. Clin. Invest. 52: 3239-3242 (1973)
14. EDMUNDSON, A.B., et al.
Biochemistry 10: 3554 (1971)
15. FOLEY, G.E., et al.:
Cancer 18: 522 (1965)
16. GOLDSTEIN, I.J., et al.:
Biochemistry 4: 876 (1965)
17. GREAVES, M.F., et al.:
Clin. Immunol. Immunopath. 4: 67 (1975)
18. GREAVES, M.F., et al.:
Leukemia Res. 4: 1 (1980a)
19. GREAVES, M.F., et al.:
Leukemia Res. 4: 15 (1980b)
20. INBAR, M., L.SACHS:
Nature 223: 710 (1969)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63: 1418 (1969)
21. JONDAL, M., et al.:
J. exp. Med. 136: 207 (1972)
22. LAEMMLI, U.K.:
Nature 227: 680 (1970)
23. LAY, W.H., et al.:
Nature 230: 531 (1971)
24. LENNERT, K., H.STEIN:
Cancer Res. 64: 31-37 (1978)

25. MAGRATH, I.T.:
J. Nat. Cancer Inst. 67: 501-514 (1981)
26. MINOWADA, J., et al.:
J. Nat. Cancer Inst. 49: 891 (1972)
27. MIYOSHI, I., et al.:
Nature 267: 843 (1977)
28. NOVOGRODSKY, A., E.KATCHALSKI:
Biochim. Biophys. Acta 228: 579 (1971)
29. OLSON, M.O.J., I.E.LIENER:
Biochemistry 6: 3801 (1967)
30. POWELL, A.E., M.A.LEON:
Exp. Cell. Res. 62: 315 (1970)
31. RAFF, M.:
Transplantation Rev. 6: 52 (1971)
32. REYNOLDS, J.A., C.TANFORD:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 66: 1002 (1970)
33. RIEHM, H., et al.:
Klin. Pädiat. 189: 89 (1977)
34. RODT, H., et al.:
Klin. Wschr. 54: 361 (1976)
35. ROSENFELD, D., et al.:
Nature 267: 841 (1977)
36. SCHNEIDER, U.:
Habilitationsschrift, Universität Erlangen-Nürnberg
Fachbereich Medizin (1981)
37. SCHWENK, H.U., U.SCHNEIDER:
Blut 31: 299 (1975)

38. SEN, L., L.BORELLA:
N. Engl. J. Med. 292: 828 (1975)
39. SHAPIRO, A.L., et al.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 815 (1967)
40. SHARON, N., H. LIS:
Science 177: 949-959 (1972)
41. SMITH, E.E., I.J. GOLDSTEIN:
Arch. Biochem. Biophys. 121: 88 (1967)
42. SPRINGER, T.A., et al.:
Nature 268: 213 (1977)
43. STAAB, H.J., et al.:
Dtsch. Med. Wschr. 102: 1082 (1977)
44. SUMNER, J.B., S.F. HOWELL:
J. Bacteriol. 32: 227 (1936)
45. SUTHERLAND, R., et al.:
Leukemia Res. 2: 115 (1978)
46. THIEL, E., et al.:
Hämatologie und Bluttransfusion, Sonderband zu
"Blut", 20: 131-145 (1977)
47. VOGLER, L.B., et al.:
N. Engl. J. Med. 298: 872 (1978)
48. WANG, J.L., et al.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 1130 (1971)
49. WEBER, J., M. OSBORNE:
J. Biol. Chem. 244: 4406 (1969)
50. WECK, M.: Z. Ärztl. Fortbild. 76: 165-168 (1982)
51. YARIV, J., et al.:
Biochim. Biophys. Acta 165: 303 (1968)

Herrn Prof.Dr.A.Ogilvie danke ich für die Überlassung des Themas, zahlreiche wertvolle Anregungen und die freundliche Betreuung.

Herrn Prof.Dr.W.Kersten gilt mein Dank für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut.

Herrn Dr.U.Schneider und Herrn Dr.K.H.Herzog bin ich für die Überlassung des Probenmaterials, das diese Arbeit erst ermöglichte, zu besonderem Dank verpflichtet.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn H.Brönner für die zuverlässige technische Hilfe und bei Frau Broghammer für das Schreiben der Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Am 18. Februar 1958 wurde ich als erstes Kind des Arztes für Allgemeinmedizin Dr. Ernst Baur und seiner Ehefrau Ursula, geborene Koch, in Nürnberg geboren.

Von 1964 bis 1968 besuchte ich in Nürnberg die Volksschule. Im September 1968 trat ich in das Neue Gymnasium Nürnberg ein und legte dort im Mai 1977 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1977/78 begann ich mein Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Nach einer Studiendauer von 12 Semestern wurde mir am 06. Dezember 1983 die Approbation als Ärztin erteilt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1979 bis zum Februar 1982 unter der Leitung von Prof. Dr. A. Ogilvie am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Erlangen-Nürnberg, Direktor Prof. Dr. W. Kersten, angefertigt.

Druck: Offsetdruckerei Karl Döres, 8520 Erlangen, Jägerstr. 3, Inh. B. Lengenfelder